

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE

PRESENTE A

UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR

JOSEE CHARTRAND

"CARACTERISATION DE LA REPONSE  
DES MEMBRANES PHOTOSYNTHETIQUES  
A DIVERS TOXIQUES  
A L'AIDE D'UNE CELLULE ELECTROCHIMIQUE  
EN VUE DE BIOESSAIS"

AOUT 1992

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

A tous ceux dont l'amour me nourrit,  
Alain, mon compagnon de vie,  
ma famille, mes ami(e)s,  
et à ce petit être à qui je donnerai  
bientôt naissance...

## RESUME

Il est possible d'étudier les transferts d'électrons de la photosynthèse à l'aide d'une petite cellule électrochimique. Dans cette cellule, l'énergie lumineuse absorbée par les pigments végétaux est transformée en espèces réduites qui sont réoxydées à une électrode de travail. Le photocourant ainsi produit est directement proportionnel au transport d'électrons photosynthétique. L'ajout de toxiques dont le mécanisme d'action est localisé au niveau de la photosynthèse a pour effet de décroître le photocourant généré en bloquant ce transfert d'électrons.

Ainsi, ce projet a consisté à vérifier et développer l'hypothèse que cette cellule pouvait constituer un biocapteur de phytotoxicité sensible, précis et exact, et, ultimement, un bioessai *in vitro* de prébalayage aquatique possiblement adéquat et représentatif de la réponse des producteurs primaires. Ces derniers constituent la base de la chaîne alimentaire et sont des éléments essentiels au maintien de l'équilibre des cycles du carbone et de l'oxygène sur Terre.

La première partie de l'expérimentation a permis de confirmer l'origine photosynthétique du photocourant et d'optimiser la réponse des thylacoïdes en absence d'inhibiteur.

La deuxième partie a permis de vérifier l'influence de divers facteurs sur la réponse du test. Une amélioration intéressante de la sensibilité à certains toxiques peut être obtenue par une diminution du potentiel imposé à 500 mV, par une diminution de la concentration de chlorophylle à 20 µg/ml et une augmentation du temps d'exposition. Pour leur part, la température et l'espèce végétale dont sont extraits les thylacoïdes sont des facteurs pouvant affecter positivement ou négativement la sensibilité du biocapteur selon la substance toxique étudiée.

Le bioessai *in vitro* à base de thylacoïdes d'épinard s'est avéré sensible à la plupart des toxiques étudiés, soient les pesticides atrazine, simazine, bromoxynil, diuron, DDT, dieldrin et pentachlorophénol, les métaux lourds mercure, cuivre, plomb, zinc et cadmium, ainsi qu'à diverses autres substances comme les nitrites, les sulfites, le SDS et le phénol. Son niveau de sensibilité à ces toxiques s'est montré comparable à celui de bioessais effectués avec des organismes entiers, soient différentes espèces d'algues et de cyanobactéries, et ce, malgré un temps d'exposition généralement plus court (5 min). Nos résultats confirment ainsi la similitude de la fonction photosynthétique entre organismes végétaux de différents niveaux d'organisation.

Pour ce qui est de la comparaison avec des bioessais reconnus que sont le Microtox<sup>MD</sup> et la truite arc-en-ciel, les résultats sont variables. Cette diversité était prévisible compte tenu que ces différents organismes vivants que sont une plante, une bactérie et un poisson, appartiennent à des règnes et des ordres phylogéniques différents.

Finalement, des essais préliminaires du biocapteur avec des échantillons récoltés sur le terrain ont démontré la présence d'un potentiel toxique pour les producteurs primaires du milieu aquatique récepteur concerné.

Par conséquent, selon nos résultats, le bioessai *in vitro* à base de membranes photosynthétiques serait donc adéquat comme test de "prébalayage" du niveau de phytotoxicité aquatique compte tenu de sa forte corrélation avec les indices de toxicité de divers toxiques fournis par les tests sur les organismes entiers visés. Ce bioessai s'avère un test d'évaluation de la toxicité pour les producteurs primaires simple, rapide, sensible, représentatif et peu coûteux.

## REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Robert Carpentier, pour la confiance et le soutien démontrés tout au long de ce travail.

Des remerciements également à la formidable et très spéciale équipe du Dr Carpentier; l'esprit qui a animé ce groupe durant mon séjour est très rare et très précieux: amitié, entraide, dynamisme, humour, joie de vivre. Je la quitte avec un pincement au coeur. Jamais je ne l'oublierai.

Un gros merci également à Alain Chalifour pour l'aide dans le traitement statistique par analyse probit des données.

Enfin, je veux exprimer ma profonde gratitude à mon conjoint, Alain, pour le soutien et la confiance indéfectibles qu'il m'a offerts durant ce travail.

## TABLE DES MATIERES

RESUME. . . . .	iii
REMERCIEMENTS. . . . .	vi
ABREVIATIONS . . . . .	ix
LISTE DES FIGURES . . . . .	x
LISTE DES TABLEAUX. . . . .	xiii
CHAPITRES	
I. INTRODUCTION	
1.1 Problématique . . . . .	1
1.2 Objectifs de la recherche . . . . .	5
1.3 Importance écologique de la photosynthèse . . . . .	7
1.4 Quelques notions de photosynthèse . . . . .	11
1.5 Principe du biocapteur à base de membranes photosynthétiques . . . . .	16
II. MATERIEL ET METHODES	
2.1 Préparation des thylacoïdes . . . . .	22
2.2 Mesures de dégagement d'oxygène . . . . .	23
2.3 Mesures électrochimiques. . . . .	25
2.4 Solvant organique utilisé (cas des pesticides). . . . .	30
2.5 Analyse des données. . . . .	30
III. RESULTATS ET DISCUSSION	
3.1 Caractérisation et optimisation de la réponse des thylacoïdes en absence d'inhibiteur . . . . .	32



3.2 Influence de divers facteurs sur la réponse du test.	41
3.2.1. Influence du potentiel imposé. . . . .	42
3.2.2. Influence de la concentration de Chl . . .	44
3.2.3. Influence du tampon . . . . .	54
3.2.4. Influence du temps d'exposition . . . . .	57
3.2.5. Influence de la température. . . . .	58
3.2.6. Influence de l'espèce végétale dont sont extraits les thylacoïdes . . . . .	66
3.3 Caractérisation et comparaison avec d'autres bioessais de la réponse des thylacoïdes à divers toxiques. . . . .	70
3.3.1. Pesticides . . . . .	72
3.3.1.1. Herbicides . . . . .	73
3.3.1.2. Insecticides . . . . .	79
3.3.2. Métaux lourds. . . . .	81
3.3.2.1. Mercure . . . . .	84
3.3.2.2. Cuivre . . . . .	90
3.3.2.3. Plomb . . . . .	94
3.3.2.4. Cadmium . . . . .	96
3.3.2.5. Zinc . . . . .	100
3.3.2.6. Retour sur l'ensemble des métaux lourds. . . . .	101
3.3.3. Autres substances. . . . .	102
3.4 Essais préliminaires avec des échantillons réels.	105
IV. CONCLUSION . . . . .	111
BIBLIOGRAPHIE . . . . .	120

## ABREVIATIONS

ATP	: adénosine triphosphate
CCL	: complexe collecteur de lumière
Chl	: chlorophylle
CI <sub>50</sub>	: concentration inhibant 50% du paramètre étudié
cyt	: cytochrome
DCBQ	: 2,5-dichloro-p-benzoquinone
DCIP	: 2,6-dichlorophénol-indophénol
DCMU	: diuron ou 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée
DDT	: 1,1,bis(p-chlorophényl)-2,2,2-trichloroéthane
Fe-S	: complexe fer-soufre
Fd	: ferrédoxine
FNR	: ferrédoxine-NADP <sup>+</sup> réductase
Ip	: intensité du photocourant
Ip <sub>max</sub>	: intensité maximale du photocourant
MV	: méthylviologène
NADPH	: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (réduit)
PC	: plastocyanine
PCP	: pentachlorophénol
PQ	: plastoquinone
PSI	: photosystème I
PSII	: photosystème II
SCE	: "standard calomel electrode"
SDS	: dodécyl sulfate de sodium ou lauryl sulfate de sodium
Tes	: acide N-tris[hydroxyméthyl]-méthyl-2-aminoéthane sulfonique

## LISTE DES FIGURES

## Figures.

1. Cycle de la matière et du flux d'énergie au  
niveau cellulaire. . . . . 9
2. Représentation schématique de la localisation et  
de la structure d'un chloroplaste typique. . . . . 12
3. Représentation de la structure des thylacoïdes  
et du transport d'électrons chez les plantes  
supérieures et les algues vertes. . . . . 17
4. Principe de la cellule photoélectrochimique à  
base de membranes photosynthétiques. . . . . 19
5. Principe de l'électrode de Clark . . . . . 24
6. Représentation schématique de la cellule  
électrochimique. . . . . 27
7. Photocourant généré par des thylacoïdes d'épinard  
en fonction du dégagement d'oxygène, à différentes  
concentrations de Chl. . . . . 33

8. Photocourant généré par les thylacoïdes d'orge et  
d'épinard à différentes concentrations de Chl. . . . 35
9. Photocourant généré par des thylacoïdes d'orge et  
d'épinard en fonction de la concentration de MV. . . 36
10. Photocourant en fonction de la concentration de MV  
à différentes concentrations de Chl . . . . . 37
11. Photocourant en fonction de la concentration de  
 $\text{NaN}_3$  à différentes concentrations de Chl. . . . . 40
12. Courant à la lumière et à l'obscurité en  
fonction du potentiel imposé. . . . . 43
13. Pourcentage d'inhibition par le  $\text{CuCl}_2$  à 550 et  
à 750 mV. . . . . 45
14. Détection du lauryl sulfate de sodium (SDS) à  
diverses concentrations de Chl. . . . . 47
15. Pourcentage d'inhibition du photocourant  
selon la concentration de  $\text{CuCl}_2$  dans les tampons  
Tes et phosphate. . . . . 55

16. Pourcentage d'inhibition du photocourant selon la concentration de $\text{HgCl}_2$ dans les tampons Tes et phosphate. . . . .	56
17. Détection du DDT ( $10^{-4}$ M) et de l'atrazine ( $5 \times 10^{-6}$ M) en fonction du temps d'exposition . . .	59
18. Détection du cuivre à différentes températures. . .	62
19. Détection de l'atrazine à différentes températures. . .	63
20. Détection de l'atrazine par les thylacoïdes extraits de feuilles d'épinard, d'orge et de tomate. . . . .	67
21. Détection du cuivre par les thylacoïdes extraits de feuilles d'épinard, d'orge et de tomate. . . . .	68
22. Détection du mercure à 20 et à 250 $\mu\text{g Chl/ml}$ . . . .	89
23. Détection du $\text{CuCl}_2$ ( $10^{-5}$ M) en fonction du pH . . . .	95
24. Essais préliminaires de détection de phytotoxicité sur deux échantillons d'effluents d'usine. . . . .	108

## LISTE DES TABLEAUX

## Tableaux.

I. Liste des produits utilisés. . . . .	28
II. $CI_{50}$ de divers herbicides à 20 et 250 ug Chl/ml. . .	49
III. $CI_{50}$ de divers insecticides à 20 et 250 ug Chl/ml. .	50
IV. $CI_{50}$ de divers métaux lourds à 20 et 250 ug Chl/ml. .	51
V. $CI_{50}$ de diverses substances à 20 et 250 ug Chl/ml. .	52
VI. Inhibition du photocourant par divers toxiques à des temps d'exposition de 5, 15 et 30 min. . . . .	60
VII. $CI_{50}$ avec intervalles de confiance à 95% obtenus par analyse probit pour le cuivre à différentes températures . . . . .	64
VIII. $CI_{50}$ avec intervalles de confiance à 95% obtenus par analyse probit pour l'atrazine à différentes températures. . . . .	64

IX. $CI_{50}$ de l'atrazine avec intervalles de confiance à 95% obtenus par analyse probit avec des thylacoïdes de différentes espèces . . . . .	69
X. $CI_{50}$ du cuivre avec intervalles de confiance à 95% obtenus par analyse probit avec des thylacoïdes de différentes espèces . . . . .	69
XI. Comparaison de la réponse à différents herbicides du bioessai à base de membranes photosynthétiques d'épinard avec celle d'autres bioessais basés sur la photosynthèse de différentes espèces d'algues . . . . .	75
XII. Comparaison de la réponse à différents insecticides du bioessai à base de membranes photosynthétiques d'épinard avec celle d'autres bioessais basés sur la croissance de différentes espèces d'algues	80
XIII. Comparaison de la réponse à différents insecticides du bioessai à base de membranes photosynthétiques d'épinard avec celle de deux bioessais reconnus, soit le Microtox <sup>MD</sup> et la truite arc-en-ciel . . .	82

XIV. Comparaison de la réponse à différents métaux lourds du bioessai à base de membranes photosynthétiques d'épinard avec celle d'autres bioessais basés sur la photosynthèse de différentes espèces d'algues. . . . .	87
XV. Comparaison de la réponse à différents métaux lourds du bioessai à base de thylacoïdes d'épinard avec celle de deux bioessais reconnus, soit le Microtox <sup>MD</sup> et la truite arc-en-ciel . . . . .	103
XVI. Comparaison de la réponse à différents toxiques du bioessai à base de membranes photosynthétiques d'épinard avec celle d'autres bioessais basés sur la croissance de différentes espèces d'algues et avec celle d'autres bioessais reconnus, soit le Microtox <sup>MD</sup> et la truite arc-en-ciel. . . .	104
XVII. Analyse chimique des deux échantillons d'effluents distincts d'une même usine utilisés pour les essais préliminaires de détection de phytotoxicité. . . . .	107
XVIII. Evaluation du bioessai à base de membranes photosynthétiques en fonction de cinq critères opérationnels généralement utilisés. .	119



## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1.1 Problématique.

Le déversement de produits chimiques dangereux dans les écosystèmes aquatiques provoque une variété de réponses complexes. Traditionnellement, c'est la composition chimique de l'eau ainsi contaminée qui est d'abord déterminée par des techniques analytiques standards. Elle fournit des données chimiques utiles. Cependant, elle ne fournit pas d'informations concernant la toxicité et la biodisponibilité de ces contaminants pour les organismes qui vivent dans l'écosystème, ni sur leurs effets sur la chaîne alimentaire. Pourtant, de telles données toxicologiques sont essentielles pour le développement d'objectifs pour la qualité de l'eau, objectifs qui devront nécessairement recommander des niveaux de contamination sécuritaires pour les organismes vivants de tous les niveaux trophiques (Munawar et Munawar, 1987).

En effet, différents organismes vivants réagissent de façons variées à une substance ou à un mélange de toxiques quelconque. Par conséquent, l'assurance qu'un produit chimique, ou qu'un effluent d'eaux usées, est non toxique pour l'ensemble des êtres vivants exige une variété de bioessais impliquant des organismes de différents niveaux d'organisation biologique (Ribo

et Kaiser, 1987). D'ailleurs, il est de plus en plus recommandé, dans le cadre d'approches écotoxicologiques intégrées, d'utiliser une combinaison de bioessais afin de mieux appréhender les dangers potentiels associés aux rejets de mélanges de toxiques complexes vis-à-vis un milieu aquatique récepteur (Bitton, 1983; Blaise et al., 1985). Notre société a donc un besoin pour des tests d'évaluation de toxicité simples, sensibles, rapides et peu coûteux. Ce besoin pour l'évaluation de la toxicité est plus évident dans l'analyse des effluents industriels, agricoles et des systèmes de traitement des eaux usées.

Cependant, une limitation aux bioessais est leur manque de spécificité. Mais, cela n'en est de toute façon pas le but; les bioessais constituent plutôt des intégrateurs des effets des mélanges de toxiques, fournissant ainsi des indices de toxicité pour des échantillons complexes. Ils permettent de prévoir une présence ou une absence de potentiel toxique et de préciser les répercussions écotoxicologiques des effluents.

De nombreux bioessais *in vitro* pouvant s'effectuer en quelques minutes et de façon peu dispendieuse ont été développés ces dernières années afin de trouver le test de "prébalayage" idéal qui précéderait des bioessais avec des organismes entiers beaucoup plus coûteux et longs (Blondin et al., 1989). Un

exemple est le développement d'une méthode basée sur les changements métaboliques d'un extrait de particules mitochondriales animales afin de prédire la toxicité aiguë chez les poissons (Blondin et al., 1989). La disponibilité de tests de "prébalayage" appropriés pourrait ainsi réduire la nécessité de l'utilisation routinière de bioessais avec organismes entiers pour tester de nombreux échantillons qui, finalement, ne provoquerons jamais de réponse toxique aiguë. Cependant, l'utilité d'un bioessai *in vitro* dans des tests de "prébalayage" dépend de sa forte corrélation avec les indices de toxicité de divers toxiques fournis par des tests sur organismes entiers (Blondin et al., 1989).

Afin de mesurer la toxicité aiguë efficacement, un système *in vitro* doit fournir une mesure simple, sensible et rapide d'un paramètre physiologique constituant un indicateur de viabilité de l'ensemble de l'organisme. Un tel paramètre doit être associé à un processus métabolique majeur contrôlé par des systèmes enzymatiques interdépendants (Dorward et Barisas, 1984). Un test *in vitro* n'est donc pas basé sur de la mortalité mais sur une mesure extrêmement sensible de la performance physiologique de l'organisme.

Etant donné la similitude de la fonction photosynthétique entre organismes végétaux de différents niveaux d'organisation,

un bioessai *in vitro* à base de membranes photosynthétiques s'intégrerait bien à une telle démarche. En effet, l'inhibition de la photosynthèse est un dommage des plus insidieux; elle affecte significativement le rôle que les producteurs primaires jouent dans la pyramide alimentaire. D'ailleurs, le mécanisme du transport photosynthétique d'électrons est le premier processus physiologique végétal affecté par plusieurs polluants. Ainsi, plusieurs herbicides, en particulier les dérivés du phénol, de l'urée et de la triazine, inhibent le transfert d'électrons (Pfister et al., 1981; Jones et al., 1986; Millie et Hersh, 1987). Les nitrites et les sulfites également (Shimazaki et al., 1984; Eversman et Sigal, 1987; Metzger et al., 1987; Sinclair, 1987), aussi bien que la plupart des métaux lourds: le cadmium et le plomb (Stratton et Corke, 1979a; Krupa et al., 1987; Becerril et al., 1988; Teige et al., 1990), le cuivre (Shioi et al., 1978; Hsu et Lee, 1988; Mohanty et al., 1989; Renganathan et Bose, 1989), le mercure et le nickel (Stratton et Corke, 1979b; Singh et al., 1989), le zinc (Tripathy et Mohanty, 1980), etc...

Donc, la mesure du taux de photosynthèse offre une méthode *in vitro* des plus intéressantes pour l'évaluation de l'impact sur l'écosystème d'un bassin récepteur. Cette approche exigerait des temps d'exposition courts. Ce facteur est tributaire de l'exposition directe des membranes photosynthétiques aux

toxiques, étant donnée l'absence de plusieurs mécanismes de tolérance: exclusion ou diminution de l'entrée du toxique reliés à la présence de membranes plasmiques et chloroplastiques, immobilisation dans la paroi cellulaire, compartimentation du toxique sous forme de complexes solubles (souvent dans les vacuoles) ou insolubles (synthèse de phytochélatines) (Woolhouse, 1983). La présence de ces mécanismes varie d'une espèce végétale à l'autre, et même d'une variété à l'autre. Par conséquent, l'exposition directe des membranes photosynthétiques devrait faire disparaître ces facteurs de différences de sensibilité aux toxiques entre espèces végétales, pour ne laisser que ceux inhérents à la membrane photosynthétique elle-même. En comparaison, des tests conventionnels de toxicité aquatique aiguë sur des microalgues telle que *Selenastrum capricornutum*, sont généralement effectués avec des temps d'exposition de 96 heures ou plus, sans compter l'entretien des cultures (Hickey et al., 1991).

### 1.2 Objectifs de la recherche.

Ce projet se situe au niveau de la recherche appliquée. Comme il sera expliqué plus loin, il a été démontré qu'il était possible d'étudier les transferts d'électrons de la photosynthèse à l'aide d'une très petite cellule électrochimique (80 ul). Dans cette cellule, l'énergie lumineuse absorbée par

les pigments végétaux est transformée en espèces réduites qui sont réoxydées à une électrode de travail (Carpentier et Mimeault, 1987; Mimeault et Carpentier, 1988; Mimeault et Carpentier, 1989). Le photocourant ainsi produit est directement proportionnel au transport d'électrons photosynthétique (Carpentier et al., 1991). L'ajout de composés toxiques qui inhibent le transport d'électrons au milieu entraîne une diminution du photocourant proportionnelle à l'effet inhibiteur et à la concentration de ces composés (Purcell et Carpentier, 1990; Purcell et al., 1990; Carpentier et al., 1991).

Ainsi, ce projet consiste à vérifier et développer l'hypothèse que cette cellule pourrait constituer un biocapteur de phytotoxicité sensible, précis et exact, et, ultimement, un bioessai *in vitro* de prébalayage aquatique possiblement adéquat et représentatif de la réponse des producteurs primaires.

Un test de toxicité peut être défini comme la mesure de la réponse d'un organisme à l'exposition à une substance toxique quelconque à différentes concentrations, tandis que dans un bioessai, un niveau connu de la réponse d'un organisme est utilisé afin de mesurer la toxicité d'une substance ou d'un effluent (Morris et al., 1984). Ainsi, ce travail vise la caractérisation du niveau de réponse des membranes

photosynthétiques à divers toxiques dans la cellule électrochimique, le tout évidemment dans le but ultime d'en vérifier l'adéquation en tant que bioessai. Plus précisément, les objectifs de ce projet de recherche sont:

- 1) caractériser et optimiser la réponse du matériel biologique utilisé en absence d'inhibiteur (section 3.1);
- 2) vérifier l'influence de divers facteurs sur la réponse du test: potentiel imposé, concentration en Chl de l'échantillon, type de tampon, temps d'exposition, température, espèce dont sont extraites les membranes thylacoïdiennes (section 3.2);
- 3) vérifier si ce biocapteur est sensible à plusieurs des produits chimiques reconnus dommageables pour la vie; caractériser et comparer avec d'autres bioessais sa réponse à ces produits (section 3.3);
- 4) effectuer un essai préliminaire du biocapteur avec des échantillons récoltés sur le terrain (section 3.4).

### 1.3 Importance écologique de la photosynthèse.

La photosynthèse est un élément essentiel au maintien de l'équilibre des cycles du carbone et de l'oxygène sur la Terre. De plus, la source ultime de presque toute l'énergie biologique terrestre est la capture de l'énergie solaire par les organismes

photosynthétiques et sa conversion en énergie chimique sous forme de biomasse (Gregory, 1989).

Cette production de matière organique par la photosynthèse est appelée production primaire, parce qu'elle détermine toutes les autres productions. En effet, les organismes photosynthétiques captent l'énergie solaire et la transforment en ATP et en NADPH. Ces derniers sont ensuite utilisés comme source d'énergie pour la fabrication de sucres et autres composantes organiques cellulaires, et ce, à partir du bioxyde de carbone et de l'eau. Simultanément, ils libèrent de l'oxygène dans l'atmosphère. Ces produits organiques riches en énergie sont ensuite dégradés en bioxyde de carbone et en eau, par les hétérotrophes aérobiques, en utilisant de l'oxygène, dans le but de générer l'ATP nécessaire à leurs propres activités. Le bioxyde de carbone ainsi formé retourne à l'atmosphère, afin d'être de nouveau utilisé par les organismes photosynthétiques. Ainsi, dans notre biosphère, les organismes photosynthétiques et hétérotrophes vivent dans un état d'équilibre dans lequel l'énergie solaire constitue la force motrice du cycle du carbone et de l'oxygène (Ramade, 1984; Gregory, 1989) (Fig.1).

Il est évident que tout impact des activités humaines sur cet état d'équilibre constitue une grande menace écologique. Ainsi, la présence accrue de polluants dans nos eaux peut



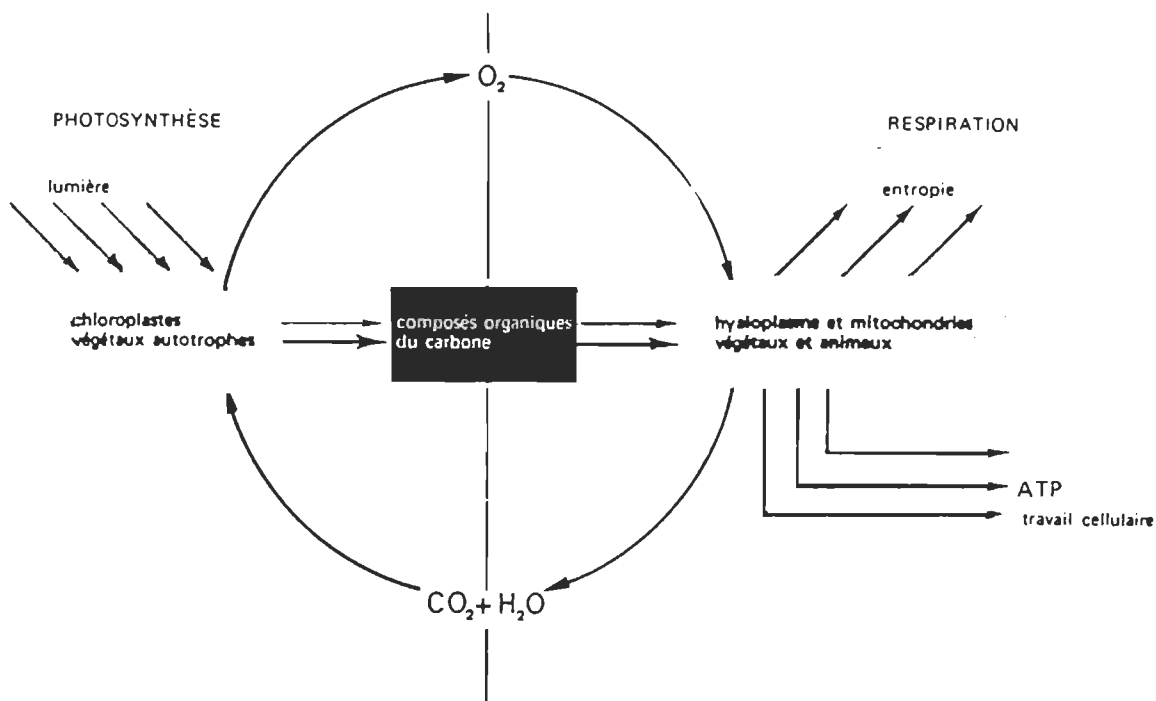


Figure 1. Cycle de la matière et du flux d'énergie au niveau cellulaire tel qu'illustré dans Ramade (1984). L'énergie solaire est la source ultime de presque toute l'énergie biologique. Les cellules photosynthétiques utilisent la lumière solaire pour produire les composés organiques du carbone, que les cellules hétérotrophes utilisent comme source de carbone et d'énergie.

entraîner une inhibition de la croissance du phytoplancton, pilier de la chaîne trophique aquatique, et par le fait même, des effets perturbateurs sur le flux d'énergie de la chaîne alimentaire, et ainsi réduire la production de biomasse aux niveaux trophiques supérieurs (Bridgham et al., 1988; Hickey et al., 1991). Par exemple, bien que la toxicité directe de l'atrazine pour les poissons apparaît être faible (Cossarini-Dunier et al., 1988), Kettle et al. (1987) ont démontré des effets indirects importants sur ces animaux dans un bassin expérimental. Comme prévu, l'introduction d'atrazine a démontré un effet sur les communautés macrophytes comme inhibiteur de photosynthèse. Mais, cela a également conduit à un déclin de la faune invertébrée, qui est essentielle aux poissons comme nourriture. Et finalement, ce déclin de la faune invertébrée a affecté négativement la diète et la reproduction des poissons.

De plus, étant donné que les algues démontrent de grandes différences de sensibilité aux toxiques (Hickey et al., 1991), des altérations dans la composition des espèces d'algues peuvent se produire sous certaines conditions de fortes expositions, déstabilisant ainsi l'ensemble de l'écosystème. Quand des conditions d'exposition sub-létale existent, aucune élimination drastique d'organismes ne se produit, mais si la croissance et la reproduction de certaines espèces sont affectées sur une certaine période de temps, le résultat final peut être le même

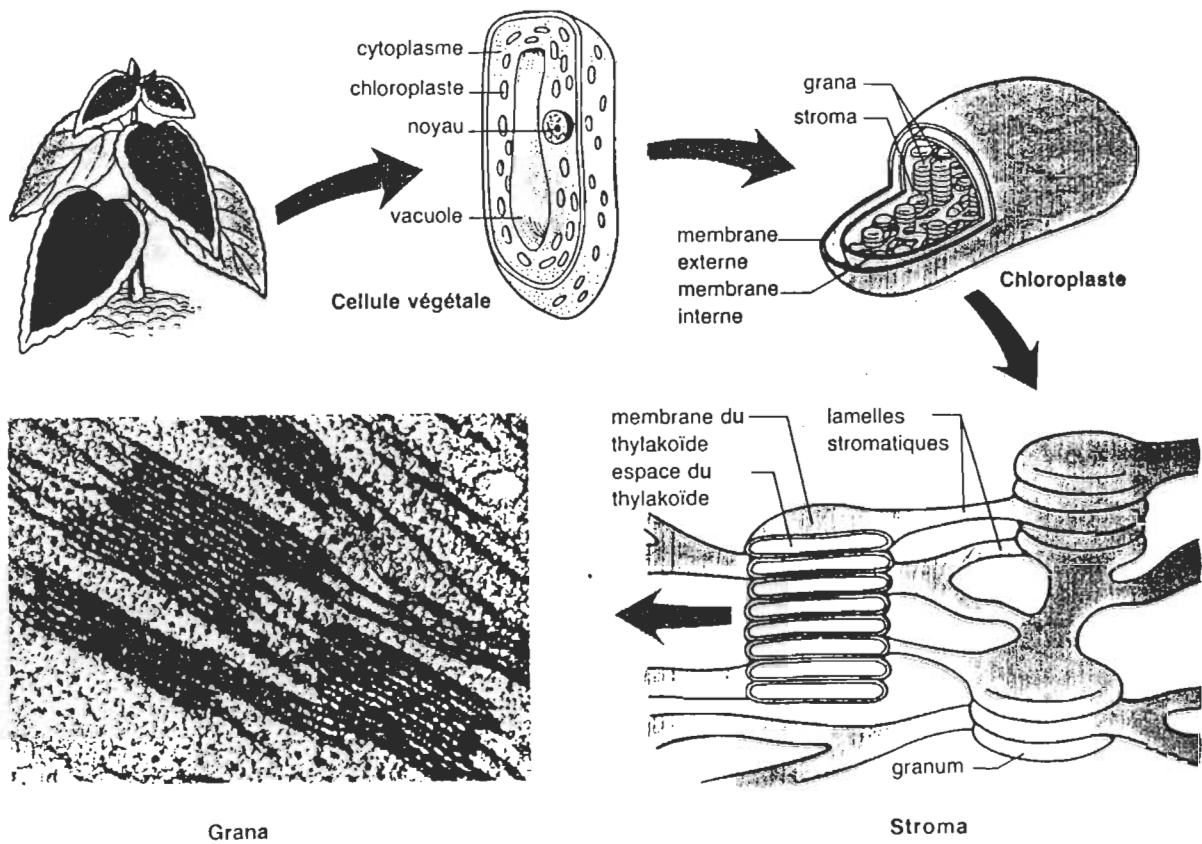
(Stratton, 1987). La phytotoxicité (réduction de la productivité primaire) est d'ailleurs considérée comme l'un des effets toxiques les plus néfastes (Neuhold et Ruggerio, 1976).

#### 1.4 Quelques notions de photosynthèse.

Il y a une grande variété d'organismes qui possèdent la capacité d'effectuer la photosynthèse, de procaryotes tels que les bactéries photosynthétiques et les cyanophycées, aux eucaryotes tels que les algues, les bryophytes et les plantes supérieures (Gregory, 1989).

Chez les eucaryotes, les réactions de la photosynthèse se produisent dans des organites particuliers à la cellule végétale appelés chloroplastes. Les chloroplastes sont entourés d'une double membrane, dont la couche interne forme à l'intérieur des replis plats, qui se referment en saccules appelés thylacoïdes. A plusieurs endroits dans le chloroplaste les thylacoïdes sont empilés et forment des grana. Les membranes thylacoïdiennes renferment les systèmes responsables des transferts d'électrons et les enzymes de la phosphorylation. Le fluide à l'intérieur du chloroplaste et baignant les thylacoïdes est appelé le stroma; il contient tous les enzymes nécessaires à la fixation du  $\text{CO}_2$  et à la synthèse des sucres (Fig.2) (Amesz, 1987; Gregory, 1989).

Les réactions de la photosynthèse peuvent être divisées en



**Figure 2.** Représentation schématique de la localisation et de la structure d'un chloroplaste typique (Mader, 1988).

deux catégories: la phase lumineuse et la phase obscure. La phase lumineuse absorbe l'énergie de la lumière et utilise cette énergie dans la production d'oxygène et de molécules riches en énergie. Dans cette phase, les électrons circulent de  $H_2O$  à NADPH (i.e., de +0.82 à -0.32 volts de potentiel d'oxydoréduction) parce que les électrons de pigments sont excités à de hauts niveaux d'énergie par la lumière absorbée (Amesz, 1987; Gregory, 1989). La phase obscure utilise les molécules riches en énergie formées lors de la phase lumineuse afin de réduire le bioxyde de carbone en sucres et autres produits organiques.

L'appareil photosynthétique renferme deux types principaux de pigments, les chlorophylles et les caroténoïdes, organisés à l'aide de protéines en complexes collecteurs de lumière (CCL) distribués entre les deux photosystèmes (I et II) selon les besoins en ATP et la composition de la lumière excitante (Foyer, 1984). Dans ces CCL, l'énergie est transmise du pigment dont le premier état excité contient le plus d'énergie à celui en contenant le moins, i.e. de celui absorbant à une longueur d'onde plus courte à celui absorbant à une longueur d'onde plus élevée, et ce, tout en canalisant cette énergie comme dans un entonnoir vers un seul type de pigment; soit vers la Chl a (680 nm), qui forme le centre réactionnel du PSII, appelé P680, soit vers la Chl a (700 nm), qui forme le centre réactionnel du PSI, et qui est appelé le P700 (Foyer, 1984).

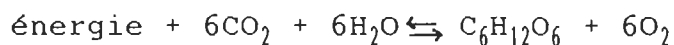
Ces photosystèmes (I et II) sont donc excités à des longueurs d'ondes différentes. Le photosystème I (PSI) est excité entre 680 et 700 nm; le photosystème II (PSII) est excité à des longueurs d'ondes inférieures à 680 nm. Les deux photosystèmes fonctionnent d'une façon séquentielle et intimement liée, dépendamment des besoins en ATP de la plante. Ainsi, il est établi aujourd'hui qu'il peut y avoir un transport linéaire d'électrons, du PSII au PSI, un transport cyclique impliquant uniquement le PSI, et un transport pseudocyclique (réaction de Mehler) (Foyer, 1984). Il sera discuté de ce dernier dans la section 1.5.

Le transport linéaire d'électrons peut être décrit comme suit. Dans le PSI, un photon est absorbé par le P700, excitant un électron qui sera transféré par une série de transporteurs, qui comprend l'accepteur primaire du PSI,  $A_0$ , puis les accepteurs  $A_1$  et complexes fer-soufre (Fe-S) appelés  $F_x$ ,  $F_A$  et  $F_B$ , et enfin la ferrédoxine (Fd), une protéine contenant également du fer et du soufre. Cette dernière transfère son électron au  $NADP^+$ , à l'aide d'un catalyseur, la ferrédoxine- $NADP^+$  réductase (FNR), le réduisant en NADPH. Simultanément, un photon est capté par le P680 qui sera excité de telle sorte qu'il cédera un électron à une molécule voisine, la phéophytine (la phéophytine est une Chl sans magnésium). Cet électron sera transféré au P700 précédemment oxydé, par un système de transport d'électrons qui

comprend deux quinones ( $Q_a$  et  $Q_b$ ), la plastoquinone (PQ), plusieurs cytochromes (cyt), et la plastocyanine (PC), une protéine contenant du cuivre. Le P680, lui-même alors oxydé, attirera un électron du donneur primaire du PSII,  $Z_2$ . Ce dernier acceptera un électron du complexe de dégagement d'oxygène qui l'aura lui-même prélevé sur l'hydrogène de l'eau, libérant de l' $O_2$  (Amesz, 1987; Gregory, 1989).

Comme dans la mitochondrie (Salisbury et Ross, 1985), ce transport d'électrons est couplé avec la phosphorylation de l'ATP par l'intermédiaire d'une force proto-motrice, qui est formée par le pompage des protons à travers la membrane du thylacoïde de différentes façons (oxydation de l'eau, migration de la plastoquinone) lors de ce transport d'électrons. Ces protons accumulés dans la cavité intérieure des thylacoïdes vont ressortir à travers le système de l'ATPase où l'ATP est synthétisé (Fig.3) (Amesz, 1987; Gregory, 1989).

La phase obscure utilise ces molécules riches en énergie, le NADPH et l'ATP, afin de réduire le bioxyde de carbone en glucose et autres produits organiques. L'équation générale, résumant les nombreuses réactions impliquées dans ce processus, démontre la formation de glucose à partir du bioxyde de carbone et de l'eau:

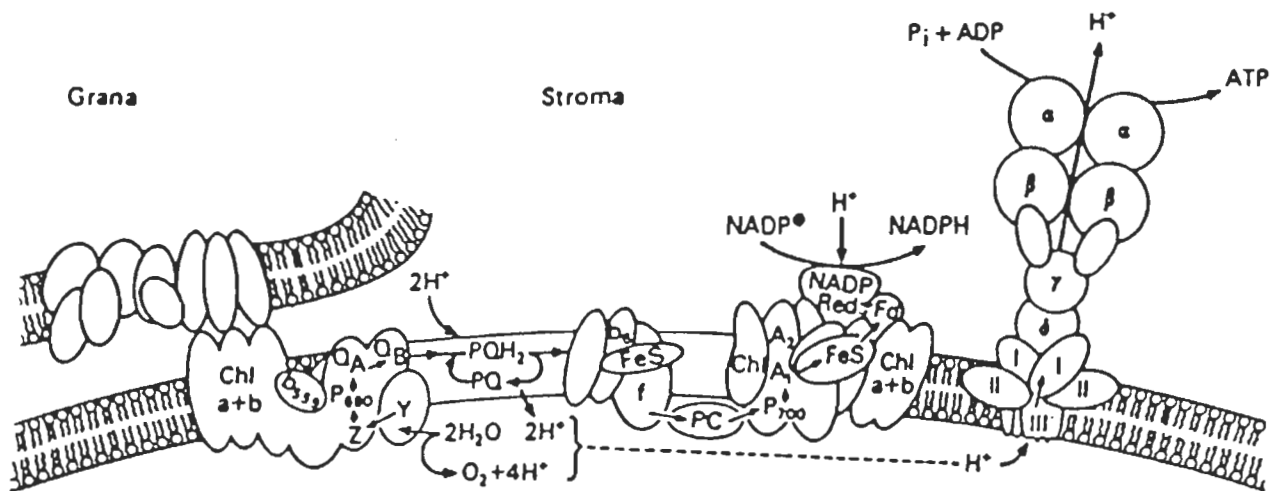


L'inverse de cette réaction est celle dans laquelle les cellules dégradent le glucose en bioxyde de carbone et en eau afin de produire l'énergie indispensable pour la vie (Amesz, 1987; Gregory, 1989).

### 1.5 Principe du biocapteur à base de membranes photosynthétiques.

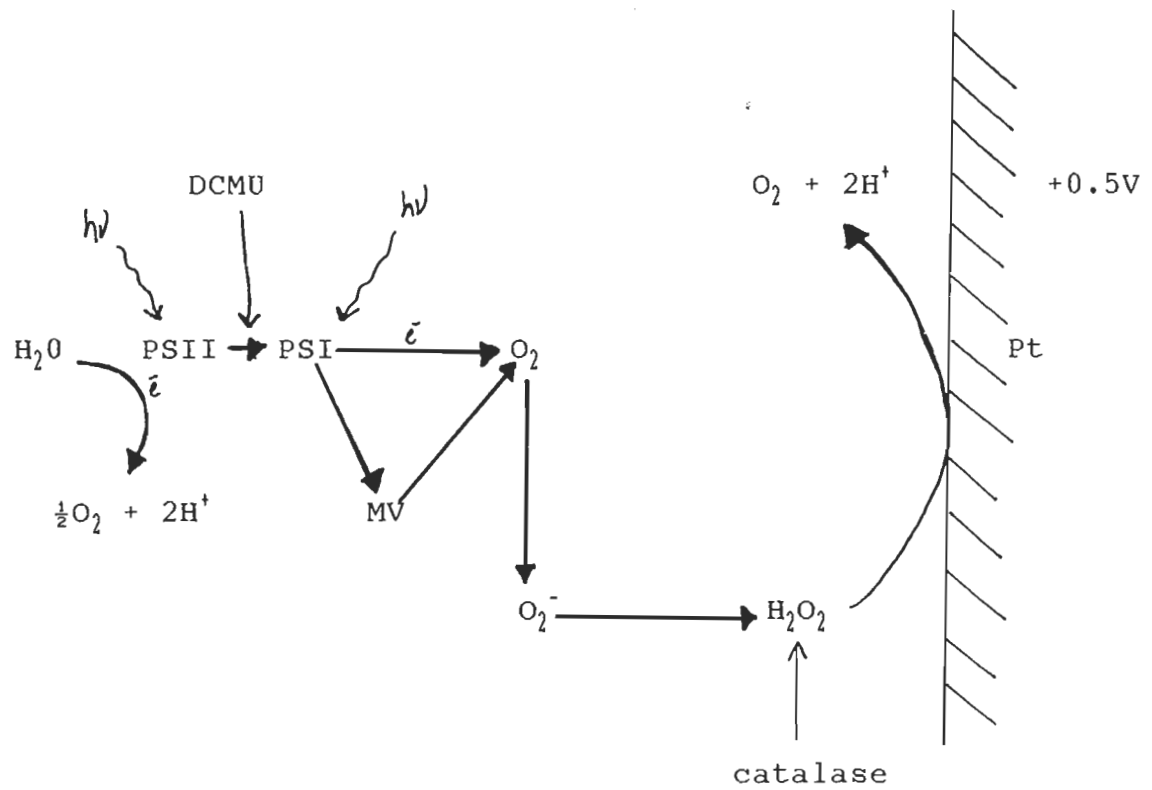
Un biocapteur électrochimique est une technique d'analyse à base de matériel biologique, capable de convertir un signal biochimique induit par la présence d'un composé cible en un signal électrique proportionnel à la concentration du composé analysé (Frew et Hill, 1987). Nous venons de voir que dans les membranes thylacoïdiennes des chloroplastes, l'énergie lumineuse est transformée en énergie chimique; la lumière est absorbée par les pigments photosynthétiques, et cette énergie est transférée aux centres réactionnels des photosystèmes I et II, où une séparation de charges se produit, conduisant à la formation d'espèces négativement chargées. Ce sont ces espèces qui, dans la cellule électrochimique à base de membranes photosynthétiques, sont utilisées pour produire du photocourant (Carpentier et Mimeault, 1987). Un transporteur d'électrons artificiel ajouté au milieu accepte les électrons des membranes





**Figure 3.** Représentation de la structure des thylacoïdes et du transport d'électrons chez les plantes supérieures et les algues vertes (Hader et Teveni, 1987).

photosynthétiques et agit comme un médiateur afin de réduire l'électrode de travail de platine. Sans cet ajout, la génération du photocourant est tout de même possible et est due à la réduction des molécules d'oxygène (dissoutes dans le milieu ambiant) par le PSI conduisant à la formation d'ions superoxydes ( $O_2^-$ ) (Goetze et Carpentier, 1990). L'oxygène est en effet connu pour être un bon accepteur d'électrons du PSI (Mehler, 1951; Robinson, 1988). Ce phénomène est appelé réaction de Mehler, du nom du premier chercheur qui l'a démontré, ou transport pseudocyclique d'électrons, l'oxygène étant le donneur primaire et l'accepteur final d'électrons. Ces ions superoxydes se transforment alors par dismutation spontanée en molécules de peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ . Ces dernières sont dégradées à l'électrode de travail de platine, produisant le photocourant (Carpentier et al., 1989). Il a été vérifié antérieurement que le peroxyde d'hydrogène réagit avec les électrodes de platine en lui léguant un électron (Guilbault et Lubrano, 1973; Salin, 1987) et peut être impliqué dans la génération du photocourant (Greenbaum, 1989). Cette hypothèse est fortement supportée par la forte inhibition du photocourant par la catalase, bien connue pour décomposer le  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $1/2 O_2$  (Carpentier et al., 1989) (Fig. 4). Le dégagement concomitant d' $O_2$  par le PSII n'interfère pas avec le suivi électrochimique de sa consommation par le PSI; il sert plutôt à stabiliser la concentration d' $O_2$  dissout dans la cellule en conservant le milieu saturé (Goetze et Carpentier, 1990).



**Figure 4.** Principe de la cellule photoélectrochimique à base de membranes photosynthétiques (voir explications dans le texte).

L'origine photosynthétique du photocourant mesuré est confirmée par la forte inhibition obtenue en présence de l'herbicide diuron ou DCMU (3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée) (Carpentier et al., 1989), un inhibiteur bien connu du transport d'électrons entre les deux photosystèmes (Trebst, 1980) (Fig. 4). La photoactivité qui demeure même en présence de diuron est tributaire d'une réaction directe entre la lumière et l'électrode de travail de platine, observable même en absence de thylacoïdes (Carpentier et al., 1989). La valeur de cette photoactivité est déduite de toutes les valeurs obtenues. Une autre confirmation de l'origine photosynthétique du photocourant est que ce dernier est directement proportionnel au dégagement d'oxygène, le paramètre généralement accepté afin de déterminer l'activité des membranes photosynthétiques (Mimeault et Carpentier, 1988).

La cellule électrochimique constitue donc un excellent outil de mesure du taux de transport photosynthétique d'électrons, l'intensité maximale du photocourant ( $I_{p_{max}}$ ) produit étant proportionnel à l'activité photosynthétique des membranes. En tant qu'application comme biocapteur, une inhibition à n'importe quel niveau de la chaîne de transport d'électrons peut être ainsi visualisée en une seule mesure. Ainsi, le photocourant généré par les membranes thylacoïdiennes contenues dans la cellule électrochimique, est inhibé en proportion de la

concentration dans le milieu de l'un ou plusieurs des inhibiteurs photosynthétiques mentionnés ci-haut.

$I_{p_{max}}$  peut être augmentée par le méthylviologène (MV), qui est connu pour accélérer la réaction de type Melher (Isawa, 1980). Le MV agit comme un catalyseur entre le PSI et l' $O_2$ . En effet il possède une plus grande capacité d'être réduit par le PSI que l' $O_2$  et il réduit plus facilement et rapidement l' $O_2$  que le PSI (Fig. 4).

La sensibilité de la cellule pour la détection de polluants pourrait être probablement améliorée par la diminution de la concentration de chlorophylle. En effet, moins de molécules d'inhibiteur devraient être nécessaires pour moins de photosystèmes présents (Carpentier et al., 1989; Purcell et Carpentier, 1990).

## CHAPITRE II

### MATERIEL ET METHODE

#### 2.1 Préparation des thylacoïdes.

Les thylacoïdes sont préparées à partir de feuilles d'épinard achetées au supermarché local, ou, lorsqu'indiqué, de plantules d'orge semées dans des bacs de vermiculite et placés en chambre de croissance pendant 10 jours, ou, de feuilles de plants de tomate cultivés en serre. Les plantules d'orge sont arrosées par l'eau du robinet sans d'autre apport nutritif, la réserve endogène des graines étant suffisante.

Orge et épinard. 100 g de feuilles dont les nervures ont été retirées, sont homogénéisées avec 300 ml de tampon Tes-NaOH pH 7.5 20 mM, sorbitol 330 mM et  $MgCl_2$  5 mM, pendant 30 s à vitesse maximale dans un mélangeur Waring. L'homogénat est ensuite filtré à travers 10 épaisseurs de coton fromage, afin d'éliminer les débris des feuilles, puis centrifugé à 2000 x g pendant 1 min (toutes les centrifugations sont effectuées dans une centrifugeuse Sorvall RC-5B de Dupont Instruments, réfrigérée à 4°C). Le culot est resuspendu dans une solution hypotonique, soit une dilution 1 dans 20 du premier tampon, afin de briser par un choc osmotique l'enveloppe des chloroplastes et ainsi libérer le stroma et les thylacoïdes fragmentés. Cette suspension est centrifugée 1 min à 4000 x g, afin de récupérer ces thylacoïdes fragmentés, qui sont ensuite resuspendus dans un

tampon Tes-NaOH 50 mM, sorbitol 330 mM,  $MgCl_2$  5 mM, NaCl 1 mM et  $NH_4Cl$  1 mM. La suspension obtenue est homogénéisée à l'aide d'un tube homogénéisateur Weaton, et sa concentration en chlorophylle est déterminée selon la méthode de Arnon (1949).

Pour ce qui est des thylacoïdes de tomate, même protocole, sauf que la composition du tampon d'homogénéisation est: Hepes-KOH pH 7.6 20 mM, Sorbitol 400 mM,  $MgCl_2$  5mM, KCl 10 mM, sodium ascorbate 5 mM, 0.5% BSA (w/w), 0.5% polyvinylpyrrolidone. Et, la composition du tampon de resuspension est: Hepes-KOH pH 7.6 20mM, Sorbitol 400 mM,  $MgCl_2$  5 mM, 3% BSA, KCl 10 mM,  $NH_4Cl$  1 mM.

Toutes ces manipulations sont effectuées à 4°C. La suspension est utilisée le jour même ou entreposée dans de l'azote liquide jusqu'à utilisation.

## 2.2 Mesures de dégagement d'oxygène.

L'illumination d'une suspension de thylacoïdes produit, du côté du PSII, un dégagement d'oxygène tributaire à la photolyse de l'eau. Simultanément, une consommation d'oxygène, due à la réduction par le PSI des molécules d'oxygène dissoutes dans le milieu, est également observée. Il est possible également de suivre le transfert d'électrons par le dégagement ou la consommation d'oxygène, à l'aide d'une électrode de Clark, qui

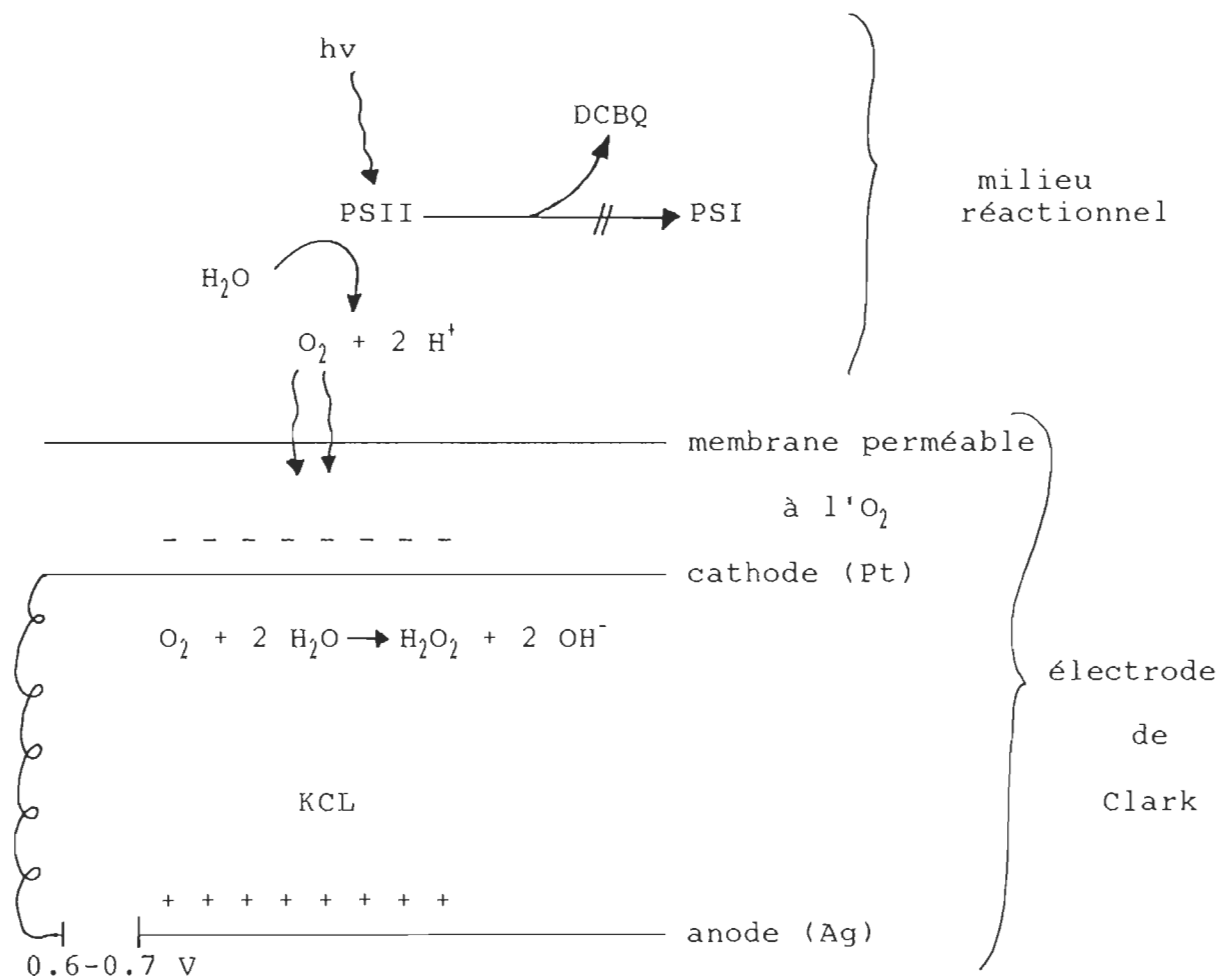


Figure 5. Principe de l'électrode de Clark. Un accepteur artificiel d'électrons du PSII, soit le DCBQ, est ajouté au milieu afin de ne mesurer que l'activité du PSII. L' $O_2$  dégagé par le PSII diffuse à travers la membrane et est réduit à la cathode de platine en  $H_2O_2$ . Le courant est directement proportionnel à l' $O_2$  réduit.



mesure le pourcentage d'oxygène dans une solution.

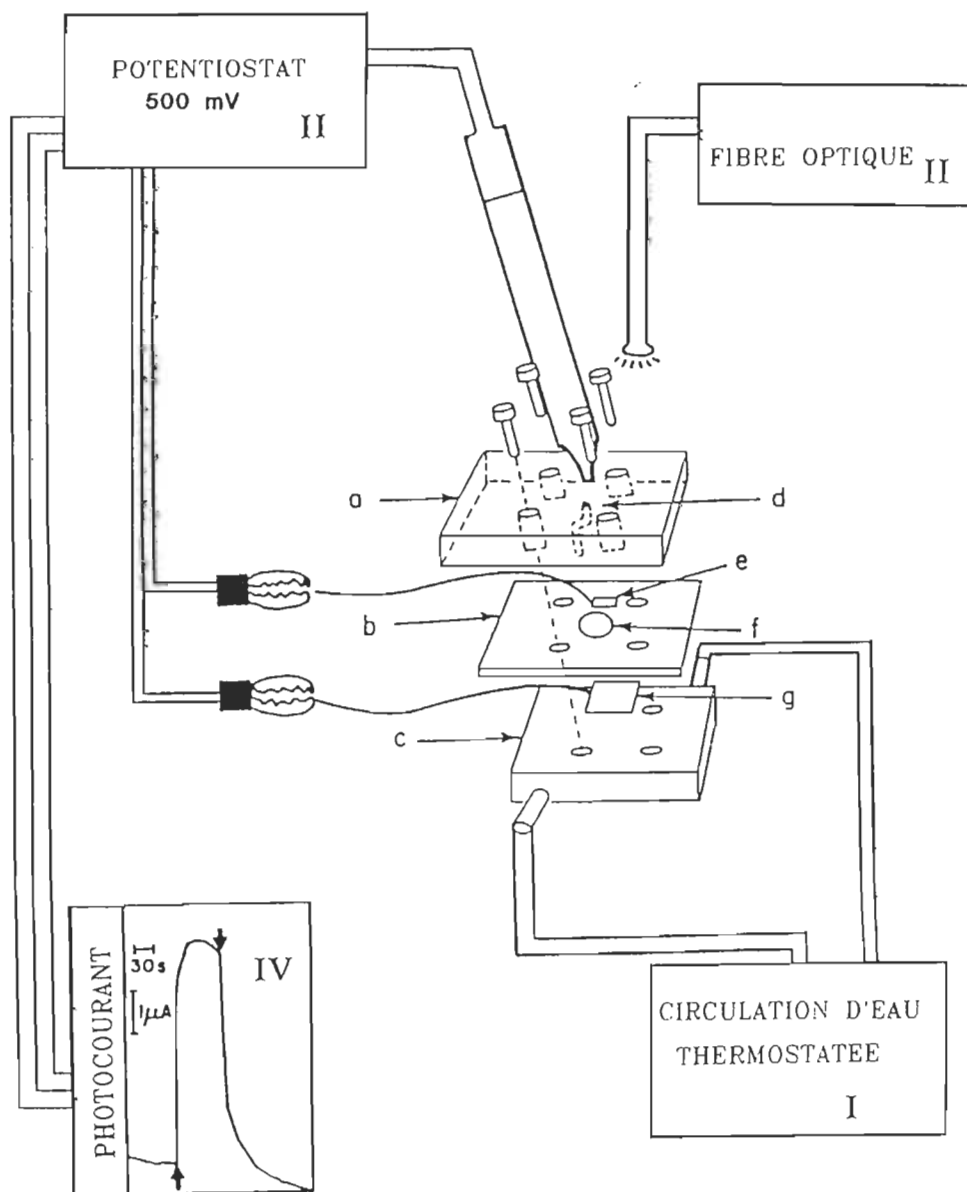
Dans cette étude, uniquement le dégagement d'oxygène est utilisé. L'électrode de Clark est jumelée à un moniteur YSI modèle 53, et la température est maintenue à 22°C à l'aide d'un bain thermostaté. Un accepteur artificiel d'électrons du PSII, soit 600 µM de DCBQ, doit être ajouté au milieu, afin de ne mesurer que l'activité du PSII (Fig. 5).

### 2.3 Mesures électrochimiques.

La cellule électrochimique utilisée est une modification de celle décrite par Allen et Crane (1976), et est détaillée à la figure 6. Un système de trois électrodes est connecté à un potentiostat Princeton Applied Research modèle 362. L'électrode de travail de platine (0.025mm d'épaisseur), ou cathode, est installée entre le joint d'étanchéité de caoutchouc et la base thermostatée, constituant le plancher de la chambre. La contre-électrode de platine (0,05mm d'épaisseur), ou anode, est installée entre le joint de caoutchouc et le couvercle de plexiglas, de façon à ce que seul un de ses coins dépasse à l'intérieur de la chambre.

Toutes les expériences sont effectuées sous une lumière verte, de façon à éviter la dégradation des pigments photosynthétiques. La suspension de membranes thylacoïdiennes,

constituée au temps 0, est introduite dans les 20 s qui suivent par un canal dans la chambre de la cellule, qui a 1 cm de diamètre et 0.1 cm d'épaisseur (80  $\mu$ l). L'électrode de référence au calomel est mise en contact direct avec cette solution de thylacoïdes par ce même canal. La cellule est continuellement équilibrée à 22°C grâce à de l'eau circulant dans la base et reliée à un bain thermostaté. A la minute 3, un potentiel de 0.5V est imposé à l'électrode de travail de platine par le potentiostat, tel que mesuré contre l'électrode de référence de calomel (Fisher) (SCE: standard calomel electrode). Un équilibre électrochimique s'établit rapidement dans la cellule. A la minute 5, une lumière blanche (109 W/m<sup>2</sup>) provenant d'une lampe quartz-halogen (250W) est dirigée directement sur la cellule grâce à une fibre optique. Le temps d'incubation total des thylacoïdes est donc de 5 min. Le courant produit ( $I_p$ ), de la période d'équilibration électrochimique à l'obscurité, jusqu'à la fermeture de la lumière blanche, est suivi sous forme de tracé à l'aide d'un enregistreur. La cinétique de l'induction du photocourant ainsi obtenue est reproduite à la figure 6 (IV). Dans ces conditions, des photocourants maximums de 3 à 8  $\mu$ A sont obtenus, selon la qualité du matériel biologique de base. En présence d'inhibiteurs photosynthétiques, l'amplitude de ce photocourant devrait être diminuée proportionnellement à leur concentration dans le milieu.



**Figure 6.** Représentation schématique de la cellule électrochimique: a, couvercle de plexiglas (6 x 5 X 1 cm); b, joint d'étanchéité de caoutchouc (6 X 5 X 0.1 cm); c, base d'acier inoxydable (6 X 5 X 1 cm) avec entrée et sortie pour la circulation de l'eau thermostatée à 22°C (I); d, lieu de positionnement de l'électrode de référence au calomel (début du canal); e, contre-électrode de platine (1 X 0.2 cm); f, chambre de la cellule (0.1 cm X 1 cm de diamètre); g, électrode de travail de platine (1 X 1 cm). Un potentiel de 500 mV vs SCE est imposé par le potentiostat (II) à la cellule, puis cette dernière est illuminée grâce à une fibre optique (III). Le courant est suivi sur un enregistreur (IV) (les flèches vers le haut et le bas indiquent respectivement l'ouverture et la fermeture de la lumière).

Tableau I. Liste des produits utilisés.

Produits	Origine
Tampon Tes (N-tris[hydroxymethyl]- methyl-2-aminoethane sulfonic acid)	Sigma
NaOH (hydroxyde de sodium)	FisherBiotech
p-sorbitol	Sigma
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O (chlorure de magnésium)	Sigma
NaCl (chlorure de sodium)	FisherBiotech
NH <sub>4</sub> Cl (chlorure d'ammonium)	FisherBiotech
DCBQ (2,5-dichloro-p-benzoquinone)	Pfalty & Bauer inc.
DCMU (diuron) (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1- dimethylurea	Sigma
DCIP (2,6-dichlorophenol-indophenol, sodium salt)	Sigma
MV (methylviologen)	Sigma
ascorbate (l-ascorbic acid)	Sigma
NaN <sub>3</sub> (azoture de sodium)	Sigma
bromoxynil (280g/l)	
atrazine (granules; 90% pure)	Ciba-Geigy

Tableau I. (suite).

Produits	Origine
simazine (#57; 80% pure)	Ciba-Geigy
dieldrin (90% pure)	Sigma
PCP (pentachlorophenol)	Sigma
DDT (1,1,bis(p-chlorophenyl)- 2,2,2-trichloroethane)	Sigma
PbCl <sub>2</sub> (chlorure de plomb)	Aldrich
HgCl <sub>2</sub> (chlorure de mercure)	Sigma
CuCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O (chlorure de cuivre)	Sigma
CdCl <sub>2</sub> (chlorure de cadmium)	Sigma
ZnCl <sub>2</sub> (chlorure de zinc)	Sigma
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (sodium sulfite)	Sigma
NaNO <sub>3</sub> (99% pur)	Sigma
SDS (approx. 99% pur) (lauryl sulfate de sodium ou sodium dodecyl sulfate)	Sigma
1,4-dioxane	Fisher
phénol. (approx. 99% pur)	Sigma
éthanol	Fisher

Tous les produits utilisés, que ce soit pour la préparation des thylacoïdes, les mesures électrochimiques ou de dégagement d'oxygène, sont listés au tableau I.

#### 2.4 Solvant organique utilisé (cas des pesticides).

Sept pesticides furent utilisés comme inhibiteurs photosynthétiques. Tous étaient très peu solubles dans l'eau. Il fut donc nécessaire de déterminer un solvant organique adéquat afin d'assurer la dissolution totale de ces différents pesticides. Le choix s'est arrêté sur l'éthanol, solvant approprié pour tous les pesticides. Il s'agissait alors de déterminer la concentration jusqu'à laquelle aucun effet sur la réponse normale des thylacoïdes n'était observé. Cette concentration pour l'éthanol fut déterminée à 1% v/v pour 20 ug/ml de chl et à 10% v/v pour 250 ug/ml de chl. Par conséquent, la concentration maximale d'éthanol utilisée pour dissoudre les différents pesticides fut toujours égale ou en dessous de 1% v/v. En effet, les concentrations maximales de solvant utilisées furent les suivantes: 0.1% pour l'atrazine, 0.01% pour la simazine, 0.01% pour le DCMU, 0.5% pour le bromoxynil, 1% pour le DDT, 0.25% pour la dieldrin, 0.1% pour le pentachlorophénol.

#### 2.5 Analyse des données.

Chaque expérience a été effectuée au minimum deux fois, à

chaque fois sur un lot de feuilles différent. Chaque point sur une courbe représente ainsi une moyenne de 2 ou 3 mesures, selon le cas.

Pour ce qui est plus particulièrement des courbes d'inhibition, les  $CI_{50}$  (concentration inhibant 50% du paramètre mesuré) ont d'abord été déterminées par méthode graphique. Puis, afin d'augmenter leur précision en linéarisant la fonction, les données de chaque courbe d'inhibition ont été statistiquement modélisées en utilisant l'analyse probit (Finney, 1971). Cette analyse est basée sur le fait que les phénomènes dose-réponse sont habituellement normalement distribués. Le pourcentage de réponse peut donc être exprimé en unités d'écart-type de la moyenne, ou unités probits (une unité probit étant égale à un écart type + 5, de façon à éviter les chiffres négatifs), en fonction du logarithme de la concentration molaire. Ainsi, un probit de 5 correspond à 50% d'inhibition, un probit de 4 à 15.9% d'inhibition, un probit de 6 à 84,1% d'inhibition, etc... Les points sont reliés par une régression linéaire, déterminée par une procédure de probabilité maximale. L'analyse fournit également un intervalle de confiance à 95% aux différentes  $CI_{50}$  ainsi déterminées. Un test de  $\chi^2$  vérifie le degré d'adéquation de la méthode; l'analyse probit s'est ainsi avérée adéquate dans la majorité des cas. Un exemple d'application de la méthode avec le SDS est présenté à figure 14 à la section 3.2.2.

## CHAPITRE III

### RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1 Caractérisation et optimisation de la réponse des thylacoïdes en absence d'inhibiteur.

Il est mentionné dans l'introduction que l'un des faits militant pour l'origine photosynthétique du photocourant est que ce dernier est directement proportionnel au dégagement d'oxygène, paramètre généralement accepté afin de déterminer l'activité des membranes photosynthétiques (Mimeault et Carpentier, 1988). Une meilleure définition de cette relation s'avérerait nécessaire avant de débiter dans ce projet. Le photocourant et le dégagement d'oxygène ont été mesurés à différentes concentrations de Chl sur trois extraits différents de thylacoïdes d'épinards. Les résultats obtenus, présentés à la figure 7, confirment cette relation, entre le photocourant et le dégagement d'oxygène, avec un coefficient de corrélation  $r$  de 0.95.

L'épinard a toujours été jusqu'à ce jour la seule espèce végétale utilisée dans la cellule électrochimique. Il nous a semblé intéressant de comparer la réponse de l'épinard à celle de l'orge, l'orge étant une plante facilement et rapidement cultivée sous conditions contrôlées en chambre de croissance.



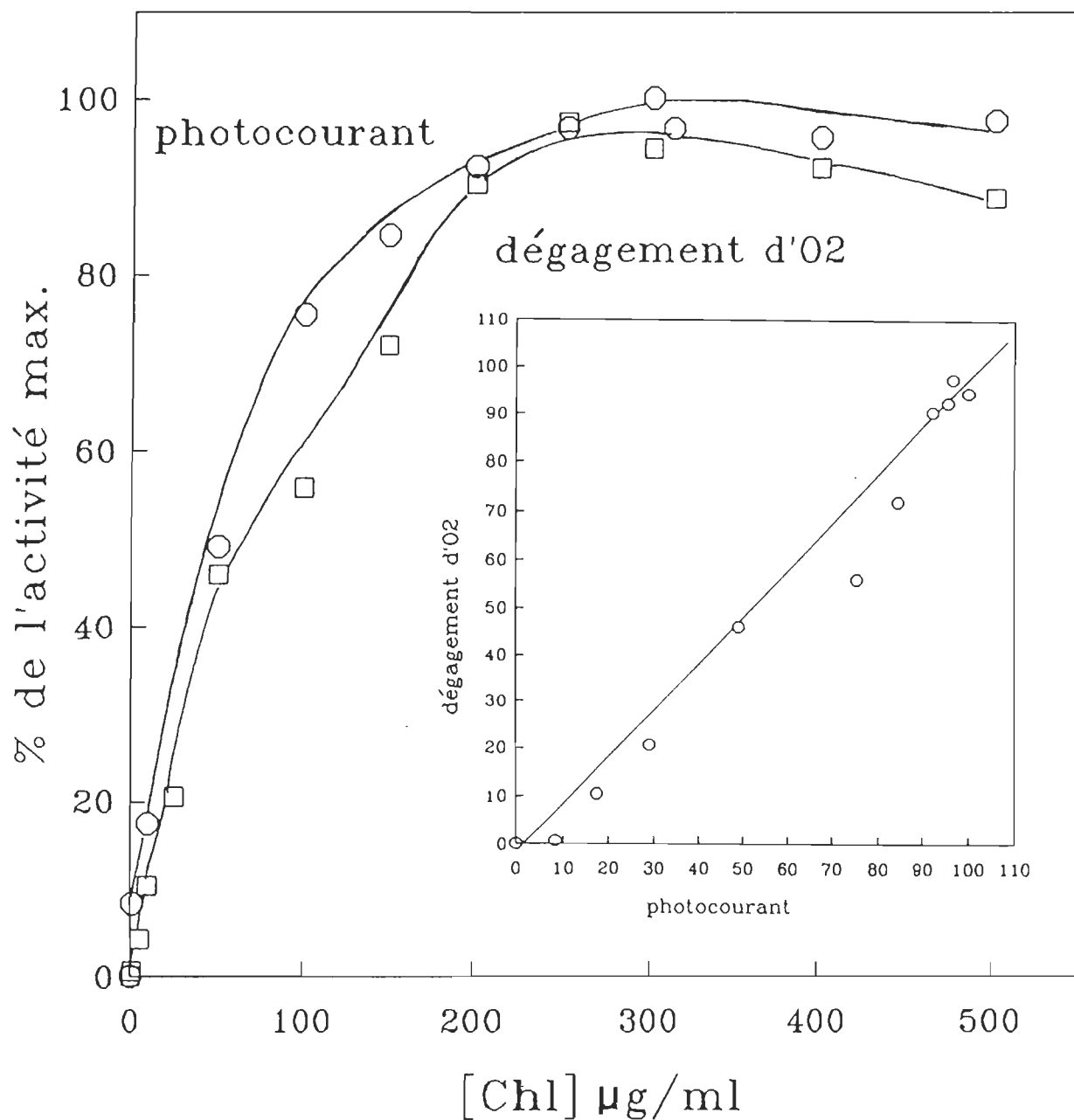
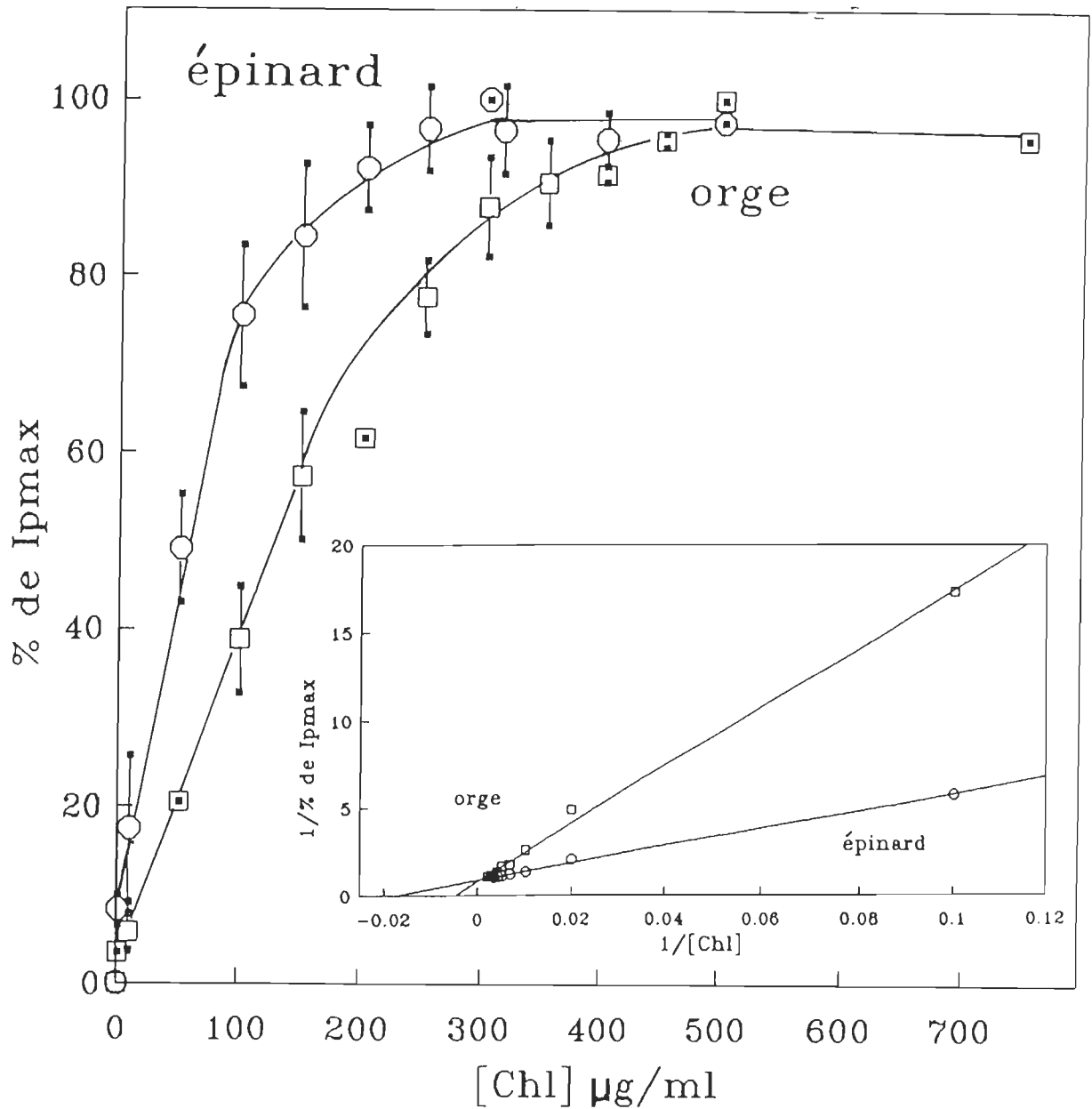


Figure 7. Photocourant et dégagement d'oxygène, en pourcentage de l'activité maximale observée, en fonction de la concentration de Chl, chez des thylacoïdes d'épinard. L'étroite relation est confirmée par la corrélation des données tel que démontrée dans l'encart. Un coefficient de corrélation de 0.95 a ainsi été déterminé. Les points représentent la moyenne basée sur trois échantillons différents.

A première vue, l'orge s'est montré une espèce végétale adéquate pour la cellule électrochimique. Que nous utilisions l'orge ou l'épinard, nous avons ainsi confirmé que le photocourant maximal ( $I_{p_{max}}$ ) augmente avec la concentration de Chl. Cependant, au-delà d'une certaine valeur de concentration de Chl, plus aucune augmentation n'est observée, compte tenu que la trop grande quantité de Chl limite la propagation de la lumière à tous les pigments présents et limite également la diffusion des particules chargées vers l'électrode. Le maximum de photocourant est donc obtenu à environ 250  $\mu\text{g/ml}$  chez l'épinard et à 400  $\mu\text{g/ml}$  chez l'orge (Fig.8). Ce résultat est confirmé par la réalisation d'un graphique de type Lineweaver-Burk (Fig.8: encart) qui démontre que la concentration pour obtenir 50% de l'activité optimale est plus faible chez l'épinard (50  $\mu\text{g/ml}$ ) que chez l'orge (175  $\mu\text{g/ml}$ ). La proportion de Chl fonctionnelle, d'un point de vue électrochimique, est plus élevée dans l'extrait d'épinard que dans celui d'orge.

Comme mentionné dans l'introduction, l'intensité du photocourant peut être augmentée par le MV, ce dernier agissant comme un catalyseur entre le PSI et l' $\text{O}_2$ . Chez l'épinard, l'expérimentation (Fig.9 et 10) démontre qu'une concentration de MV entre 0.01 et 0.1 mM est optimale, allant jusqu'à tripler le photocourant pour une concentration de Chl supérieure à 100  $\mu\text{g/ml}$ . Par contre, le MV montre très peu d'effet sur l'orge



**Figure 8.** Photocourant ( $I_{pmax}$ : Intensité maximale du photocourant) en fonction de la concentration de Chl, en pourcentage de l'activité maximale observée, chez des thylacoïdes d'orge et d'épinard. Le maximum d'activité est obtenu à une concentration plus élevée chez l'orge (400  $\mu g/ml$ ) que chez l'épinard (250  $\mu g/ml$ ). Les points représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type sur la base de trois échantillons différents. Ce résultat est confirmé par un graphique de type Lineweaver-Burk (en encart) qui démontre que la concentration où 50% du photocourant est atteint est de 50  $\mu g/ml$  chez l'épinard et de 175  $\mu g/ml$  chez l'orge.

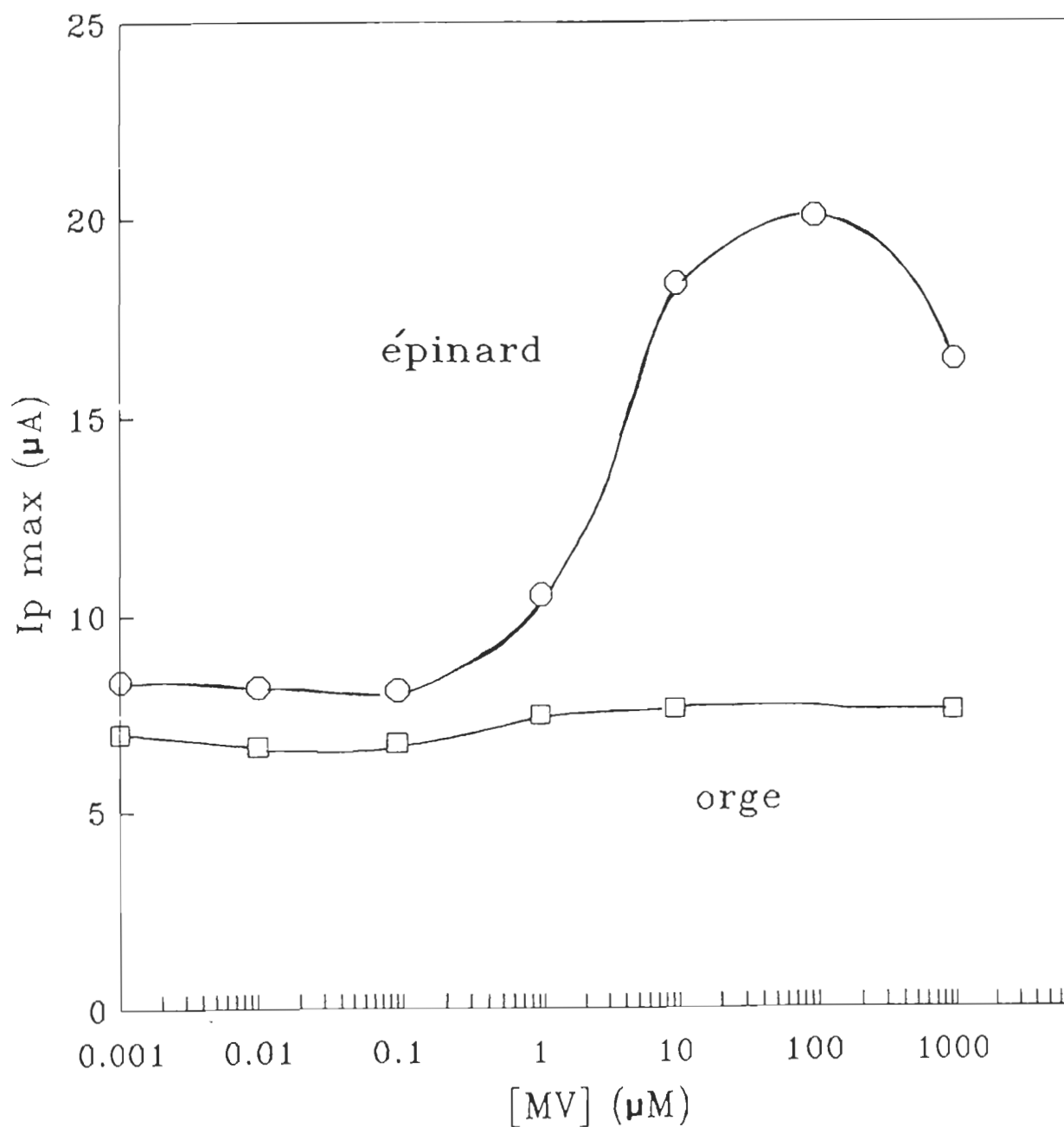
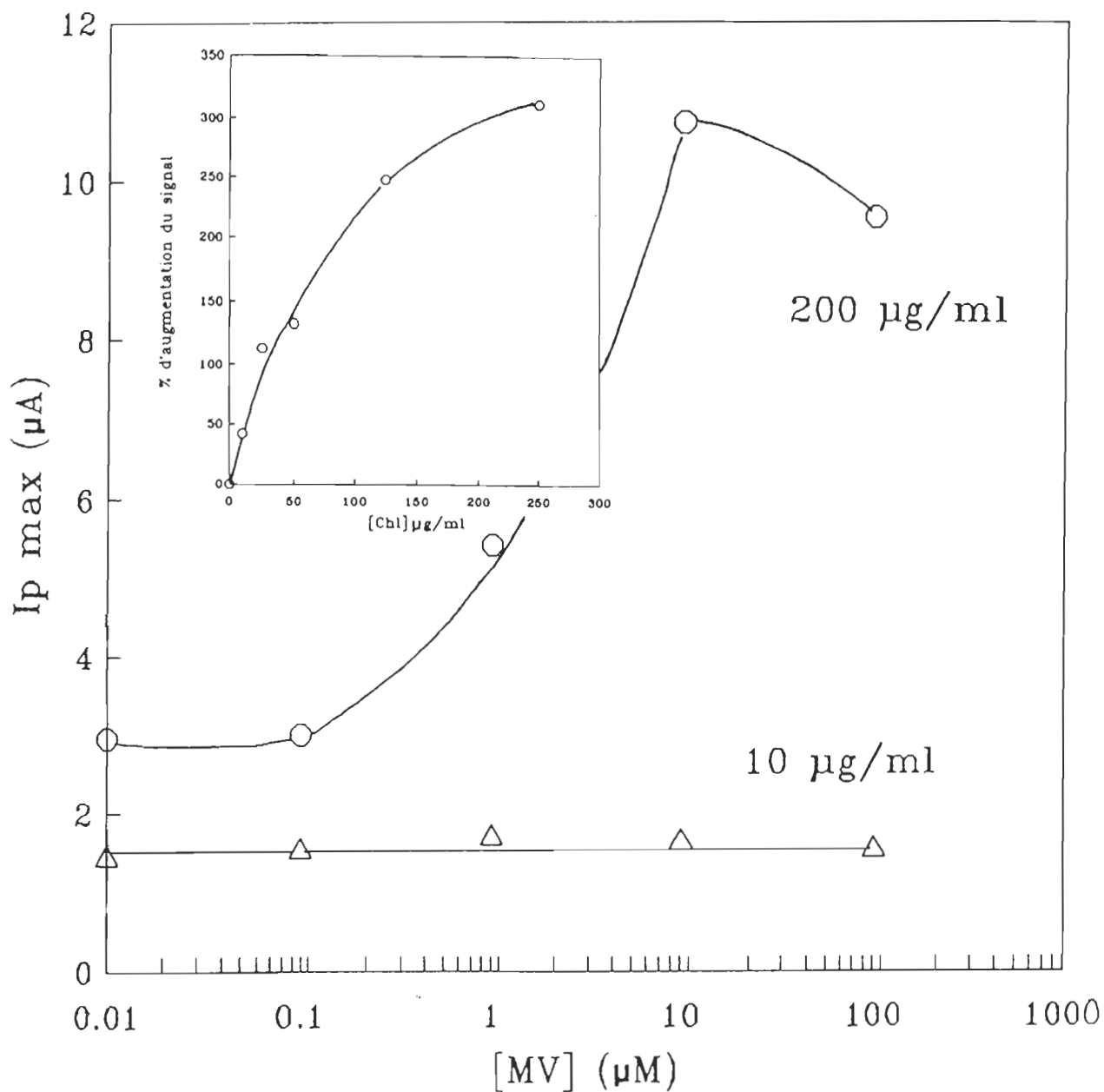


Figure 9. Photocourant ( $I_{p \max}$ ) en fonction de la concentration en MV chez des thylacoïdes d'orge et d'épinard, à une concentration de Chl de 100  $\mu g/ml$ . Le MV à la concentration optimale de 100  $\mu M$  est très efficace pour augmenter le photocourant chez l'épinard, mais n'a presque aucun effet sur l'orge. Les points représentent la moyenne basée sur trois échantillons différents.



**Figure 10.** Photocourant en fonction de la concentration de MV à une concentration de Chl de 10  $\mu g/ml$  et de 200  $\mu g/ml$ . La figure démontre que l'efficacité du MV d'augmenter le photocourant diminue avec la concentration de Chl. Ce phénomène est confirmé par le graphique en encart où le pourcentage d'augmentation du signal avec 0.01 mM de MV en fonction de la concentration de Chl est représenté. Les points représentent la moyenne basée sur trois échantillons différents.

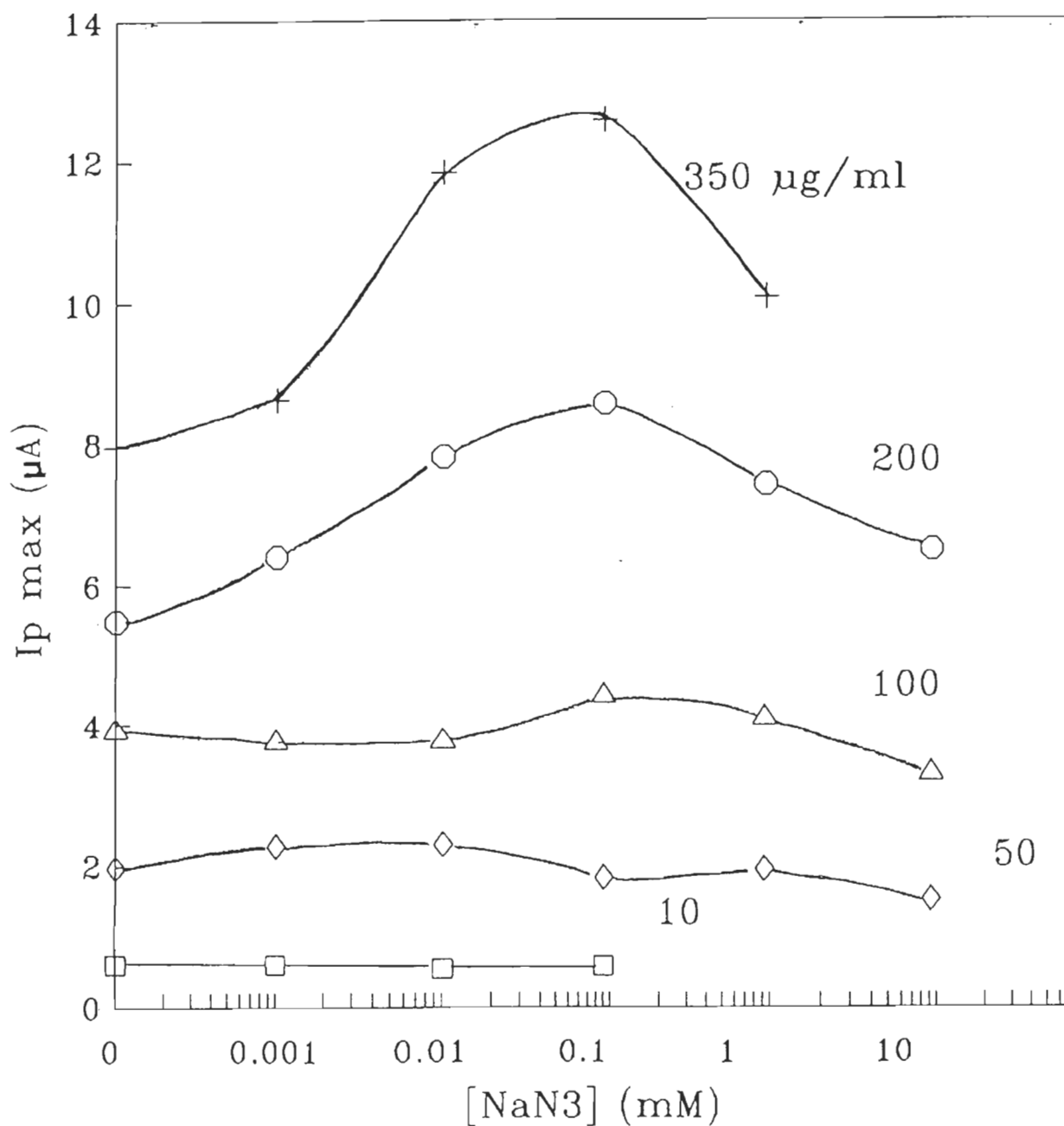
(Fig.9), où ces résultats négatifs ont été obtenus à plusieurs reprises.

Compte tenu que pour une même concentration de Chl, l'activité photoélectrochimique est supérieure chez l'épinard comparativement à l'orge, le choix de l'orge comme espèce dont sont extraites les membranes thylacoïdiennes utilisées, fut écarté. La décision fut favorisée par le fait que des épinards de culture biologique, sans pesticides, devinrent disponibles au supermarché, et par l'argument que le but du présent travail était de voir à la pertinence des membranes photosynthétiques en général dans la cellule électrochimique en tant que bioessai possible. L'adéquation de l'espèce dont sont extraites les membranes thylacoïdiennes utilisées sera discutée plus loin.

Des résultats antérieurs avaient conduit à l'espoir d'augmenter la sensibilité de la cellule aux toxiques grâce à une faible concentration de Chl combinée à la présence d'un accepteur artificiel d'électrons (Purcell et Carpentier, 1990). On remarque à la figure 10 que la concentration optimale de MV pour une concentration de Chl de 10  $\mu\text{g/ml}$  est de seulement 0.001 mM, et que l'efficacité du MV à augmenter le photocourant diminue avec la diminution de la concentration de Chl. Ce fait est important puisqu'il annule ainsi la possibilité d'augmenter le signal de façon appréciable à faibles concentrations de Chl,

là où la sensibilité du biocapteur pourrait être augmentée. L'utilisation du MV devenant inutile, son utilisation a donc été omise lors de toutes les expériences suivantes.

Une suspension de thylacoïdes isolés contient plusieurs enzymes, en particulier la catalase, enzyme décomposant le peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène étant nécessaire à la production du photocourant, la neutralisation de la catalase serait donc préférable. L'azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) est un fort inhibiteur de la catalase (Isawa, 1980). La concentration optimale de ce composé a donc été déterminée à différentes concentrations de Chl (Fig.11). L'inhibition de la catalase doit se manifester par une augmentation des photocourants mesurés. La concentration optimale de  $\text{NaN}_3$  est d'environ 0.1 mM à une concentration de Chl supérieure à 100  $\mu\text{g/ml}$ . A une concentration inférieure de Chl, le  $\text{NaN}_3$  a peu ou pas d'effet d'augmentation sur le photocourant, ce qui était prévisible puisque plus l'extrait est dilué, moins il devrait y avoir de catalase. L'utilisation de l'azoture de sodium devient donc également inutile là où la sensibilité du biocapteur devrait être augmentée. Par conséquent, son utilisation peut être omise de la même façon que le MV. A remarquer qu'à une concentration supérieure à 0.1 mM, le  $\text{NaN}_3$  a un effet inhibiteur sur le transport d'électrons à toutes les concentrations de Chl.



**Figure 11.** Photocourant ( $I_{pmax}$ ) en fonction de la concentration de  $NaN_3$  à différentes concentrations de Chl, soit 10, 50, 100, 200 et 350  $\mu g/ml$ . La concentration optimale s'avère être autour de 0.1 mM à une concentration de Chl supérieure à 100  $\mu g/ml$ . A une concentration inférieure de Chl, le  $NaN_3$  a peu ou pas d'effet d'augmentation sur le photocourant. A une concentration supérieure à 0.1 mM, à toutes les concentrations de Chl, le  $NaN_3$  a un effet inhibiteur sur le transport d'électrons. Les points représentent la moyenne basée sur trois échantillons différents.



### 3.2 Influence de divers facteurs sur la réponse du test.

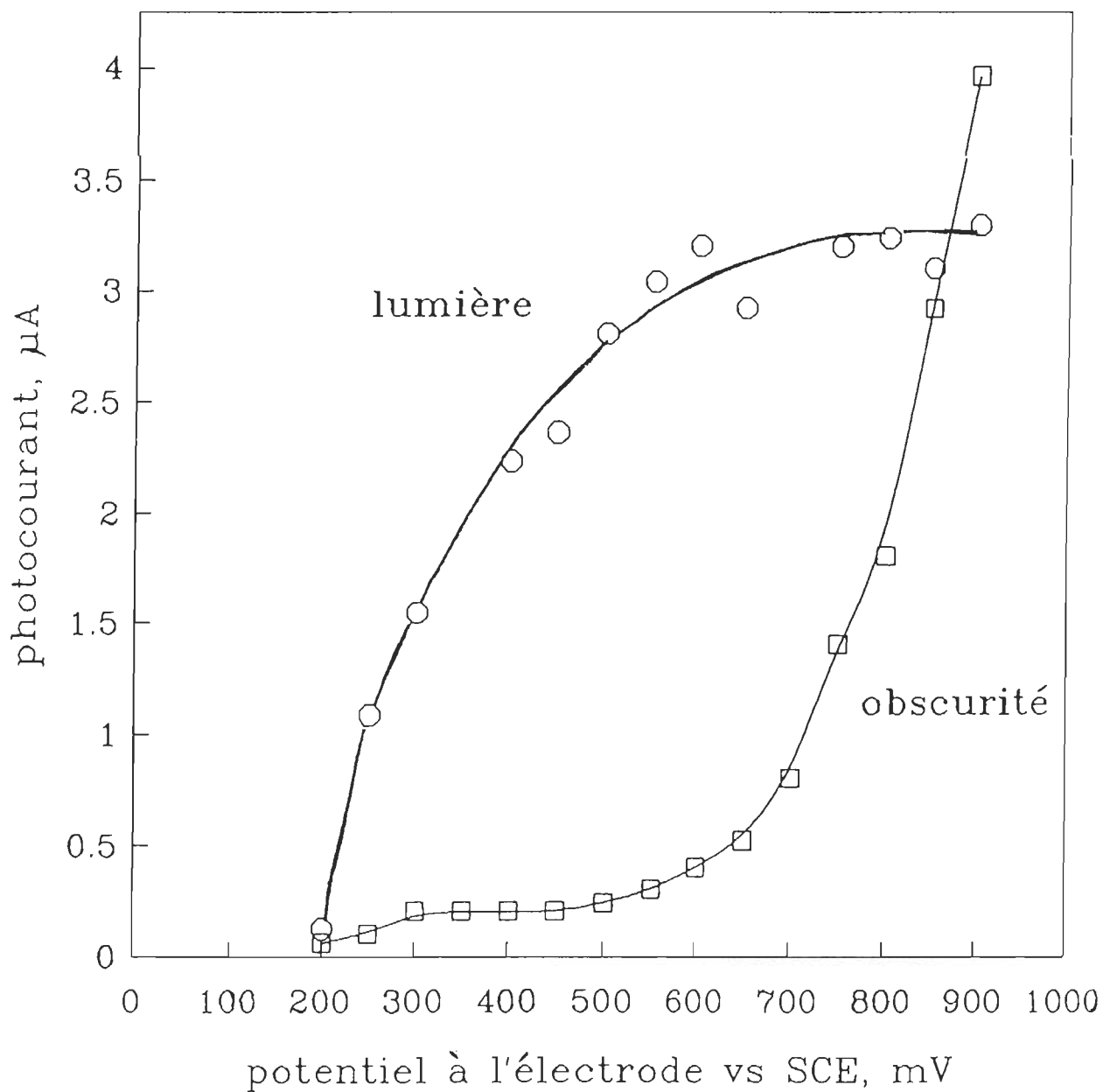
Plusieurs variables peuvent affecter la réponse des thylacoïdes à l'intérieur d'une cellule photoélectrochimique. Nous les avons divisées en 4 groupes:

- i) les variables reliées aux électrodes (matériel dont elles sont constituées, conditions de leur surface, qualité de leurs contacts avec le potentiostat, distance entre elles);
- ii) les variables électriques (potentiel imposé);
- iii) les variables reliées à la solution (nature, concentration et vitalité des thylacoïdes, type de tampon, pH, concentration et type d'électrolytes);
- iv) les variables externes (température, temps, lumière).

Lors de la plupart des expériences effectuées, ces variables ont été maintenues constantes. Cependant, en parallèle avec la caractérisation de la réponse des thylacoïdes à divers toxiques, nous avons investigué l'influence de certaines de ces variables sur la réponse toxicologique des thylacoïdes afin d'augmenter la sensibilité du biotest. Les paramètres dont l'influence a été étudiée sont: le potentiel imposé, la concentration de Chl, le type de tampon, le temps d'exposition au toxique, la température et l'espèce dont sont extraites les membranes thylacoïdiennes.

### 3.2.1. Influence du potentiel imposé.

Le maximum de photocourant étant obtenu à un potentiel de 750 mV (Mimeault et Carpentier, 1988), nous avons d'abord cru idéal de travailler à ce potentiel. Toutefois, l'apparition d'un fort courant d'équilibration à l'obscurité à ce potentiel constitua un problème lors des efforts effectués afin d'augmenter la sensibilité de la cellule. Une caractérisation du courant électrique obtenu à la lumière et à l'obscurité en fonction du potentiel imposé sur la cellule fut entreprise. Les résultats sont présentés à la figure 12. Il en ressort que jusqu'à un potentiel de 500 mV le courant à l'obscurité est relativement faible ( $\pm 0.2 \mu\text{A}$ ). Cependant, il augmente rapidement à une allure d'apparence logarithmique par la suite, pour être environ 7 fois plus élevé à 750 mV ( $\pm 1.4 \mu\text{A}$ ). Il en est de même pour le temps d'attente afin d'atteindre la stabilité dans ce courant à l'obscurité (résultats non présentés); plus le courant à l'obscurité est élevé, plus son équilibre est long à atteindre. Ce facteur est important compte tenu du délai d'équilibration alloué (2 min) et de la dégradation du matériel biologique avec le temps. Pour ce qui est du photocourant, il apparaît à partir de 200 mV pour décrire une courbe asymptotique avec un plateau à environ 600 mV. Donc, le potentiel de 500 mV fut considéré le plus adéquat compte tenu son faible courant à l'obscurité, son temps d'équilibration à l'obscurité



**Figure 12.** Courant à la lumière et à l'obscurité en fonction du potentiel imposé, tel que mesuré à l'électrode de référence au calomel (SCE). Les mesures ont été effectuées en mode potentiostatique avec des échantillons de thylacoïdes ayant une concentration de Chl de 125  $\mu\text{g/ml}$ . Les points sur le graphique représentent la moyenne de deux expériences.

court (moins de 2 min) et son photocourant relativement fort, soit environ 90% du photocourant maximal. De plus, il s'est avéré à l'usage que de travailler à un tel potentiel diminuait grandement les problèmes d'artéfacts électriques divers.

Suite à ces résultats, nous avons vérifié si une modification du potentiel imposé pouvait influencer la réponse des membranes photosynthétique aux toxiques. Nous avons utilisé le cuivre pour vérifier si la réponse des membranes serait similaire à 500 mV et 750 mV. Les résultats démontrent que oui: la courbe obtenue à 500 mV est identique à celle de 750 mV (Fig.13). En effet, une diminution du potentiel imposé de 750 à 500 mV n'entraîne qu'une baisse de photocourant d'environ 10% sur l'ensemble des mesures obtenues, et ne modifie en rien la  $CI_{50}$  de l'inhibiteur. Ainsi, toutes les autres expériences furent effectuées à 500 mV.

### 3.2.2. Influence de la concentration de chlorophylle.

Comme mentionné dans l'introduction, nous avons espoir d'améliorer la sensibilité de la cellule pour la détection de toxiques par une diminution de la concentration de Chl. En effet, le taux de réactivité d'un toxique avec les membranes thylacoïdiennes devrait être augmenté si le rapport "molécules d'inhibiteur/photosystèmes" est augmenté.

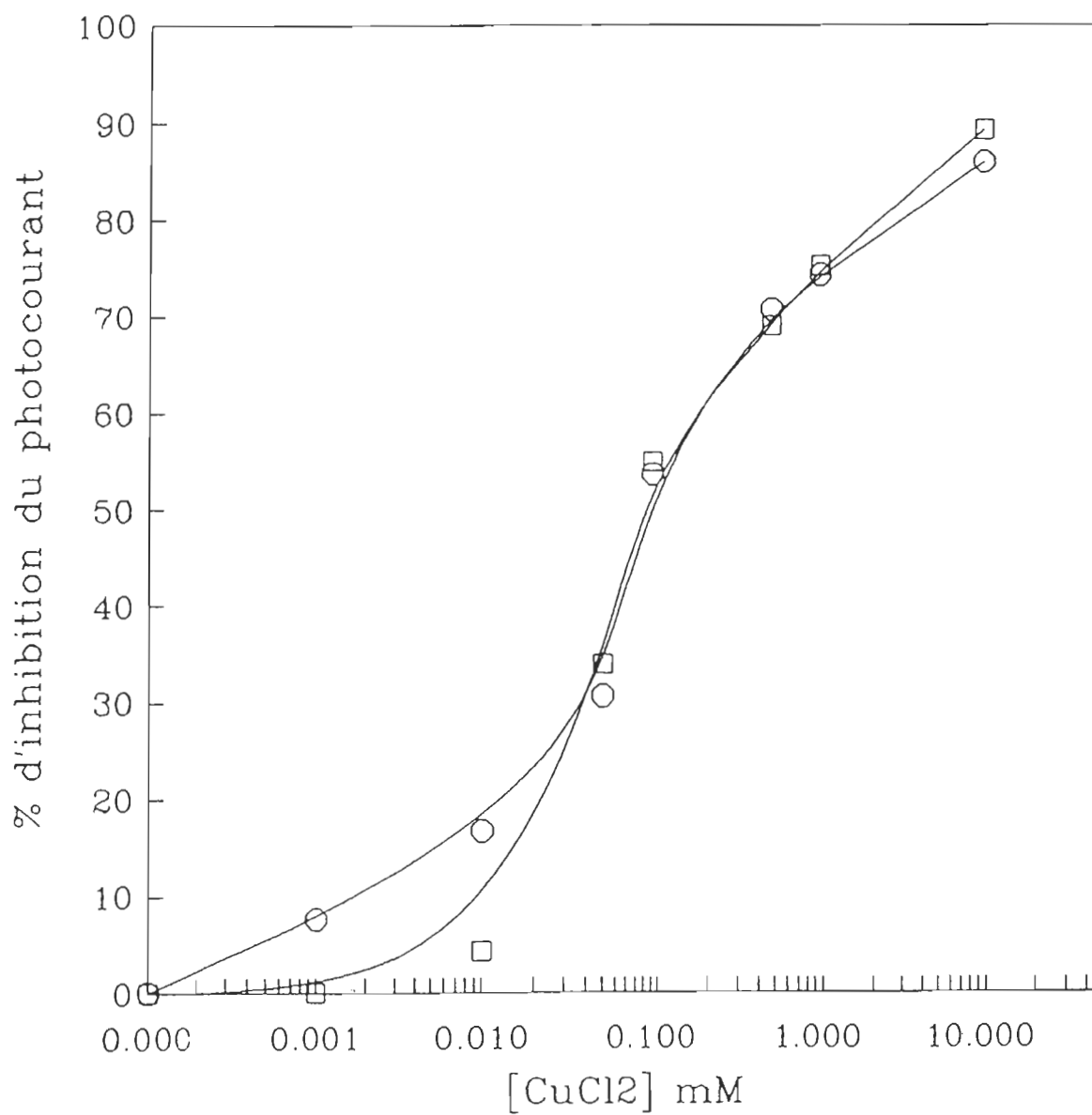


Figure 13. Pourcentage d'inhibition par le  $\text{CuCl}_2$  à 500 (-○-) et à 750 mV (-□-) à une concentration de Chl de 125  $\mu\text{g/ml}$ . Les points sur le graphique représentent la moyenne de deux expériences.

L'expérimentation a effectivement démontré que la sensibilité de la cellule pouvait être améliorée par ce moyen. Ainsi, la concentration de toxique qui provoque 50% d'inhibition du photocourant semble directement proportionnelle à la concentration de Chl dans la cellule, tel que le démontre la détection du lauryl sulfate de sodium (SDS) illustré à la figure 14. L'absence de recouvrement des différentes valeurs de  $CI_{50}$  avec leur intervalle de confiance à 95% respectif, indique bien que ce facteur affecte directement et significativement les valeurs de  $CI_{50}$ .

Cependant, l'importance de cette augmentation de sensibilité est moins importante que prévue. En effet, avec environ 10 fois moins de Chl, nous nous attendions à une  $CI_{50}$  dix fois moindre, la concentration de Chl représentant la quantité de thylacoïdes présents, donc de photosystèmes présents. Au contraire, la sensibilité augmente seulement d'un facteur de 2 à 3 environ pour l'ensemble des substances toxiques (Tableaux II, III, IV et V).

Une modification dans l'accès aux sites d'inhibition peut probablement expliquer ces observations expérimentales. En effet, lorsque nous diminuons la concentration de Chl, nous ne modifions en rien le tampon, ainsi la composition ionique ( $MgCl_2$ , NaCl) du milieu demeure la même. Il y a plus d'ions disponibles,

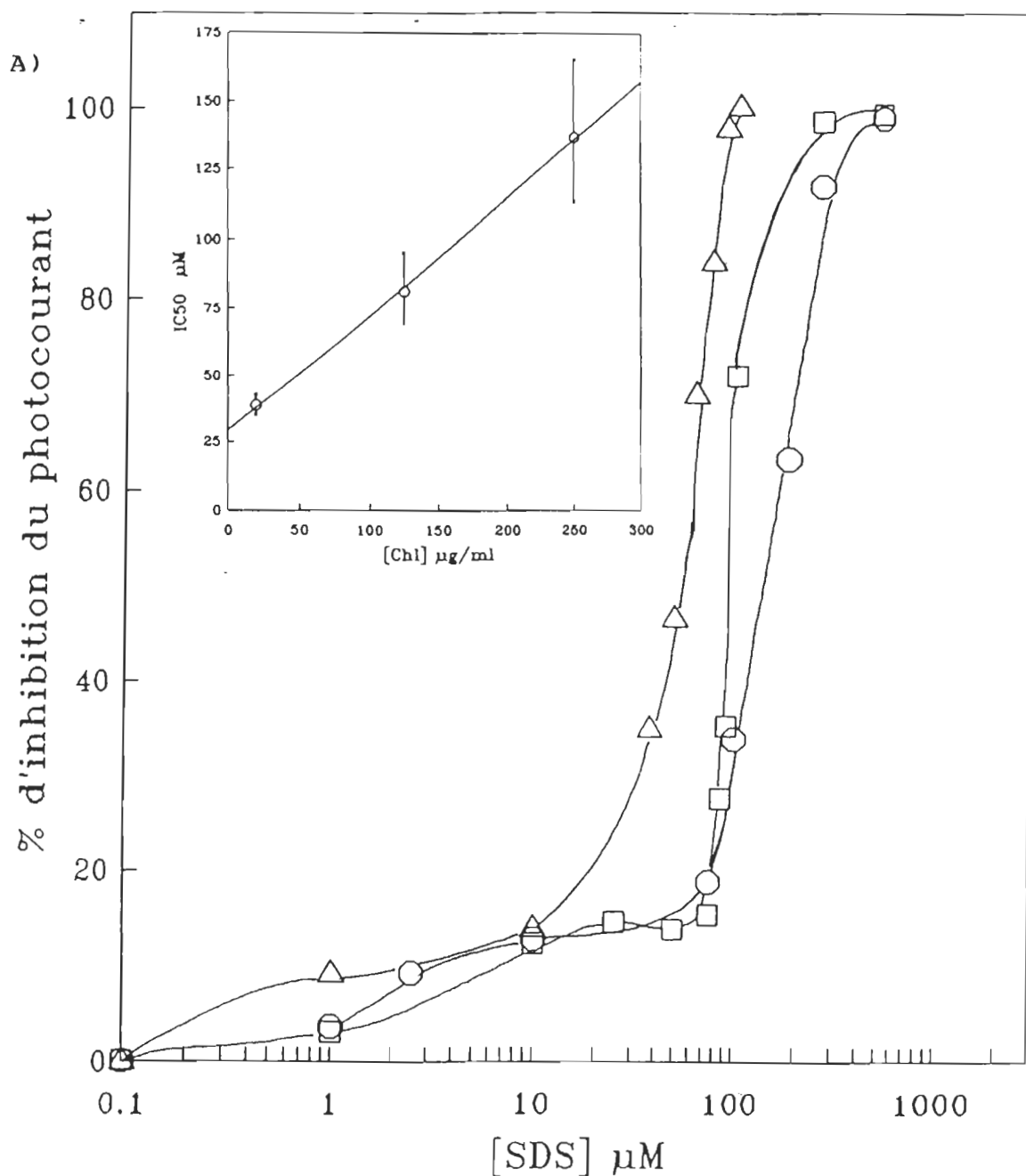
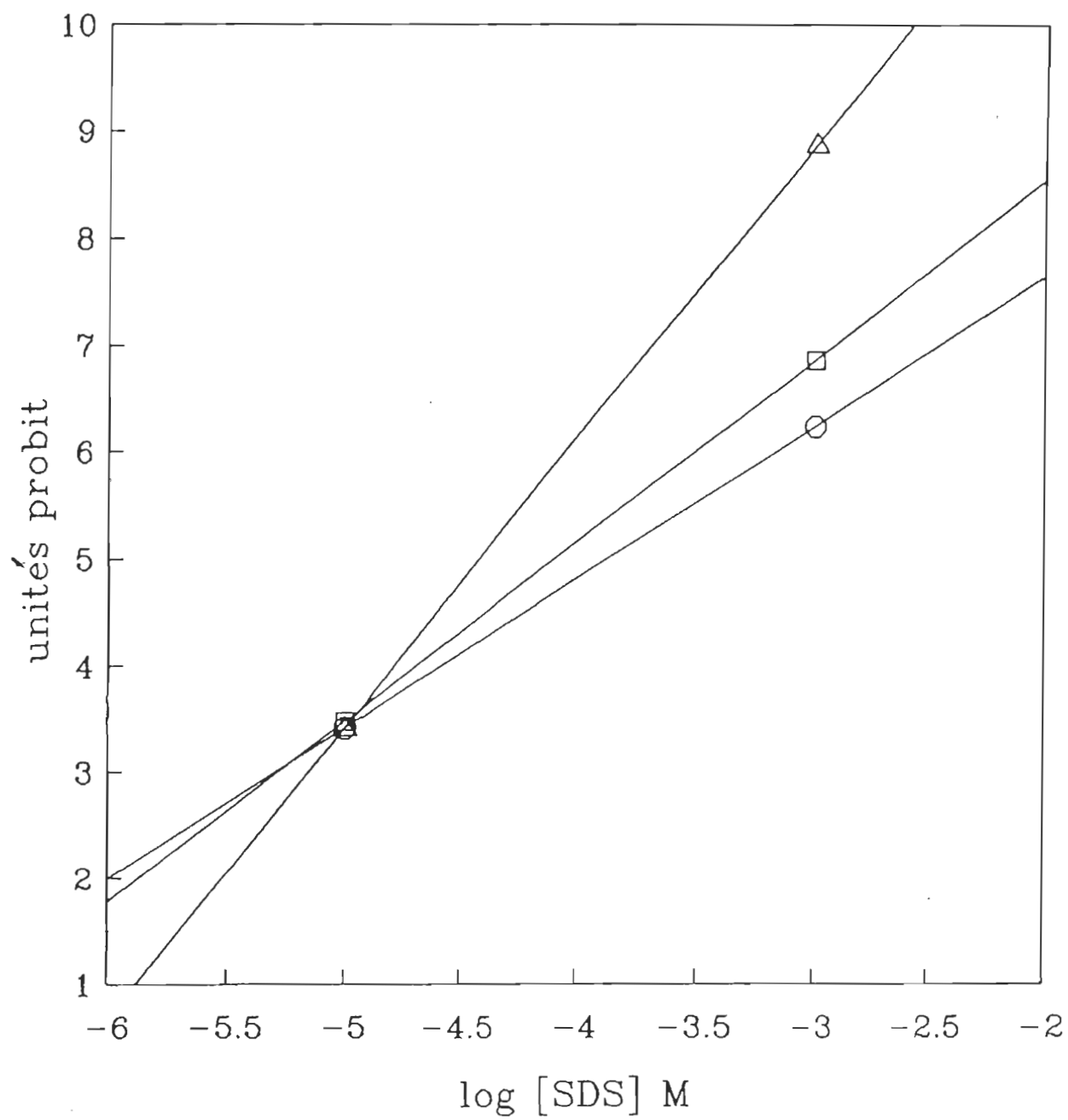


Figure 14. Détection du SDS à diverses concentrations de thylacoïdes (exprimé en Chl): (—△—), 20 µg/ml; (—□—), 125 µg/ml; (—○—), 250 µg/ml. A) % d'inhibition du photocourant en fonction du logarithme de la concentration molaire de SDS; B) % d'inhibition exprimé en unités probit en fonction du logarithme de la concentration molaire de SDS (voir section 2.5). La sensibilité (voir les valeurs de  $CI_{50}$  avec leur intervalle de confiance à 95% respectif dans l'encart) augmente significativement avec la diminution de la concentration de Chl.

B)





**Tableau II.**  $CI_{50}$  de divers herbicides à 20 et à 250  $\mu\text{g}$  Chl/ml. La sensibilité du biocapteur augmente avec la diminution de la concentration de Chl d'un facteur d'environ de 2 pour ce qui est des herbicides.

herbicide	$CI_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )		facteur d'augmentation de sensibilité <sup>a</sup>
	250 $\mu\text{g}$ Chl/ml	20 $\mu\text{g}$ Chl/ml	
atrazine	3.80	1.70	2.24
simazine	2.00	1.10	1.80
diuron	0.80	0.45	1.78
bromoxynil	116.90	48.40	2.42

<sup>a</sup> calculé ainsi:  $CI_{50}$  250  $\mu\text{g}$  Chl/ml /  $CI_{50}$  20  $\mu\text{g}$  Chl/ml

Tableau III.  $CI_{50}$  de divers insecticides à 20 et à 250  $\mu\text{g}$  Chl/ml. La sensibilité du biocapteur augmente avec la diminution de la concentration de Chl d'un facteur d'environ 1.5 pour ce qui est de la dieldrin et du pentachlorophénol, et de plus de 10 pour le DDT.

insecticide	$CI_{50}$ (mM)		facteur d'augmentation de sensibilité
	250 $\mu\text{g}$ Chl/ml	20 $\mu\text{g}$ Chl/ml	
DDT	no	0.427	+10.0
dieldrin	1.25	0.813	1.53
PCP	0.153	0.103	1.48

no: aucune inhibition observée jusqu'à 10 mM

Tableau IV.  $CI_{50}$  de divers métaux lourds à 20 et à 250  $\mu\text{g}$  Chl/ml. La sensibilité du biocapteur augmente avec la diminution de la concentration de Chl d'un facteur de 2 à 20 pour ce qui est des métaux lourds.

métal lourd	$CI_{50}$ (mM)		facteur d'augmentation de sensibilité
	250 $\mu\text{g}$ Chl/ml	20 $\mu\text{g}$ Chl/ml	
plomb	1.8	0.34	5.3
mercure	0.16	0.008	20.0
cuivre	0.12	0.055	2.2
cadmium	5.7	2.75	2.1
zinc	4.0	1.4	2.9

Tableau V.  $CI_{50}$  de diverses substances à 20 et à 250  $\mu\text{g}$  Chl/ml. La sensibilité du biocapteur augmente avec la diminution de la concentration de Chl d'un facteur de 2 à plus de 10 pour ce qui est de ces substances.

substance	$CI_{50}$ (mM)		facteur d'augmentation de sensibilité
	250 $\mu\text{g}$ Chl/ml	20 $\mu\text{g}$ Chl/ml	
Nitrites	200	90	2.2
Sulfites	0.60	0.25	2.4
SDS	0.137	0.038	3.6
dioxane	1170 <sup>f</sup>	117	+10.0
phénol	40	10	4.0
éthanol	no	1630 <sup>f</sup>	-----

no: aucune inhibition observée jusqu'à 1630 mM

<sup>f</sup>  $CI_{45}$   
<sup>i</sup>  $CI_{30}$

et la densité de charges adjacentes à la surface membranaire est augmentée. Barber et al. (1977) ont démontré que les conditions produisant l'empilement des thylacoïdes seraient associées à une densité de charge élevée sur la surface membranaire, et inversement, le désemplément des thylacoïdes à une faible densité de charge. Ainsi, cet empilement des thylacoïdes entraîne probablement une baisse de l'accès aux sites d'inhibition pour la plupart des toxiques. En effet, le PSII constitue pour la majorité d'entre eux le site d'action principal et il est situé principalement dans les régions empilées des thylacoïdes (grana) (Foyer, 1984).

De plus, l'importance de cette augmentation de sensibilité est quelque peu variable d'une substance inhibitrice à l'autre (Tab. II, III, IV et V). Effectivement, la sensibilité des thylacoïdes d'épinard aux pesticides, au Cu, au Cd et au Zn est accrue d'un facteur d'environ de 2 à 3, celle au Pb l'est de 5, celle du DDT et du dioxane de plus de 10, et celle au Hg de 20. Cette disparité dans les facteurs d'augmentation est probablement tributaire des modes d'inhibition différents. Par exemple, le Pb, en plus d'interférer avec le transport d'électrons au niveau du PSII, modifie également l'intégrité structurale des thylacoïdes (Irmer et al., 1986). Pour sa part, le Hg inhibe plutôt du côté du PSI (voir section 3.3.2), photosystème principalement situé dans les régions désemplées

des thylacoïdes, non affectées par une modification de la densité de charges adjacentes à la surface membranaire.

### 3.2.3. Influence du tampon.

L'influence de la concentration d'un toxique sur la réponse des thylacoïdes peut être affectée par divers facteurs dont les trois principaux sont: i) le taux de réactivité avec la membrane thylacoïdienne; ii) le taux de réactivité avec l'électrode de travail; iii) le taux de réactivité avec des constituants du milieu tampon.

Ce dernier facteur n'est pas négligeable. En effet, nos premières études sur la réponse des membranes thylacoïdiennes dans la cellule électrochimique ont été effectuées dans un tampon phosphate. Ainsi, si l'on compare les valeurs observées à 250 µg/ml de Chl, les  $CI_{50}$  pour le  $CuCl_2$  et le  $HgCl_2$  dans un tampon phosphate sont de 0.72 mM et de 1.80 mM respectivement, alors que dans le tampon Tes elles sont de 0.12 mM et 0.16 mM (Fig.15 et 16). Ce phénomène s'explique par le fait que le tampon phosphate a tendance à précipiter les cations métalliques, diminuant et stabilisant ainsi leur concentration sous forme libre dans le milieu. A cet égard, le tampon Tes n'est pas le choix idéal non plus, puisqu'il aurait légèrement tendance à former des complexes solubles avec les ions  $Cu^{2+}$  (Good

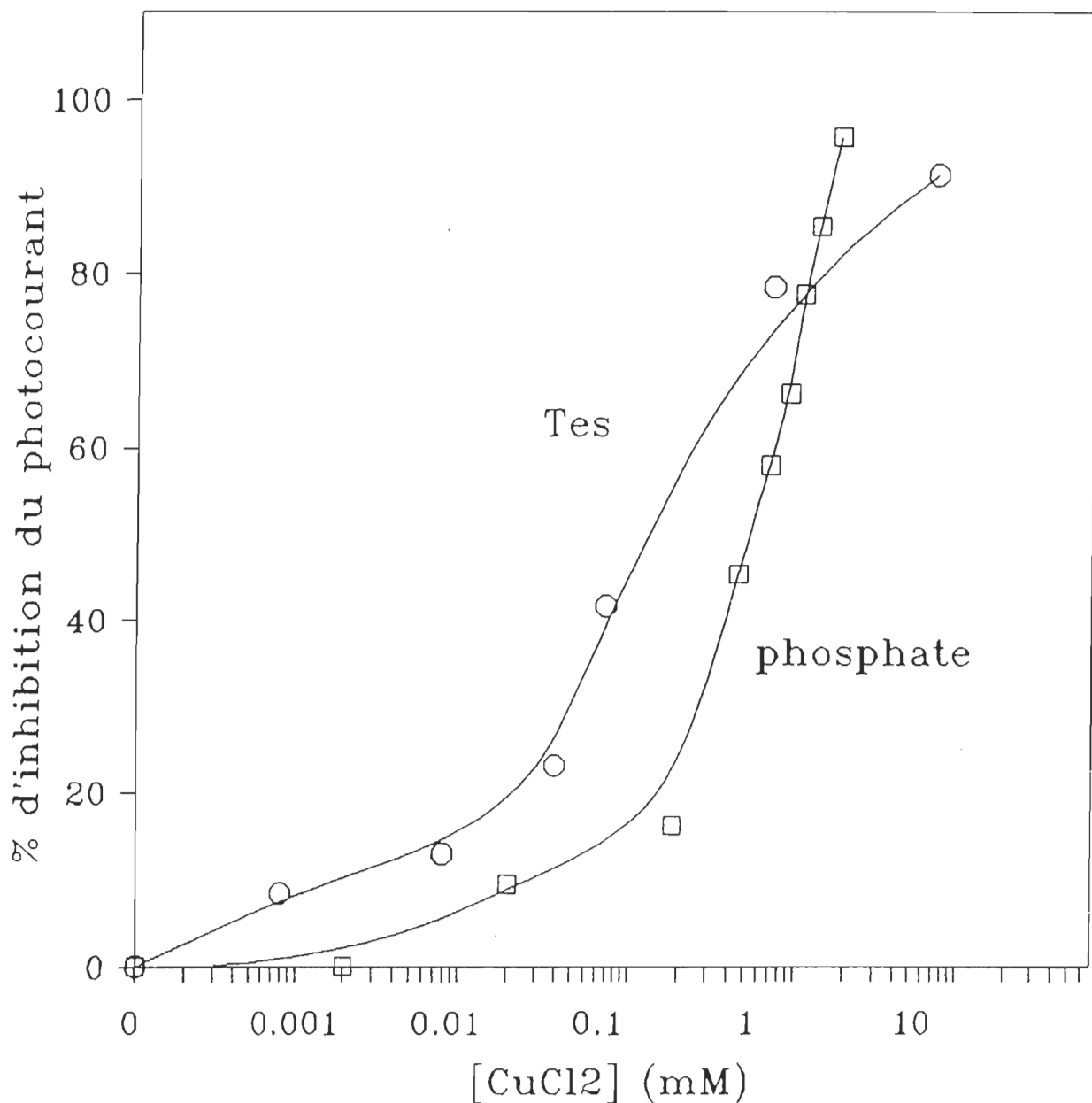


Figure 15. Pourcentage d'inhibition du photocourant selon la concentration de  $\text{CuCl}_2$ , dans deux tampons différents, soit les tampons Tes et phosphate. L'inhibition est plus rapide dans un tampon Tes que dans un tampon phosphate. L'expérimentation a été effectuée à une concentration de Chl de 250  $\mu\text{g/ml}$ .

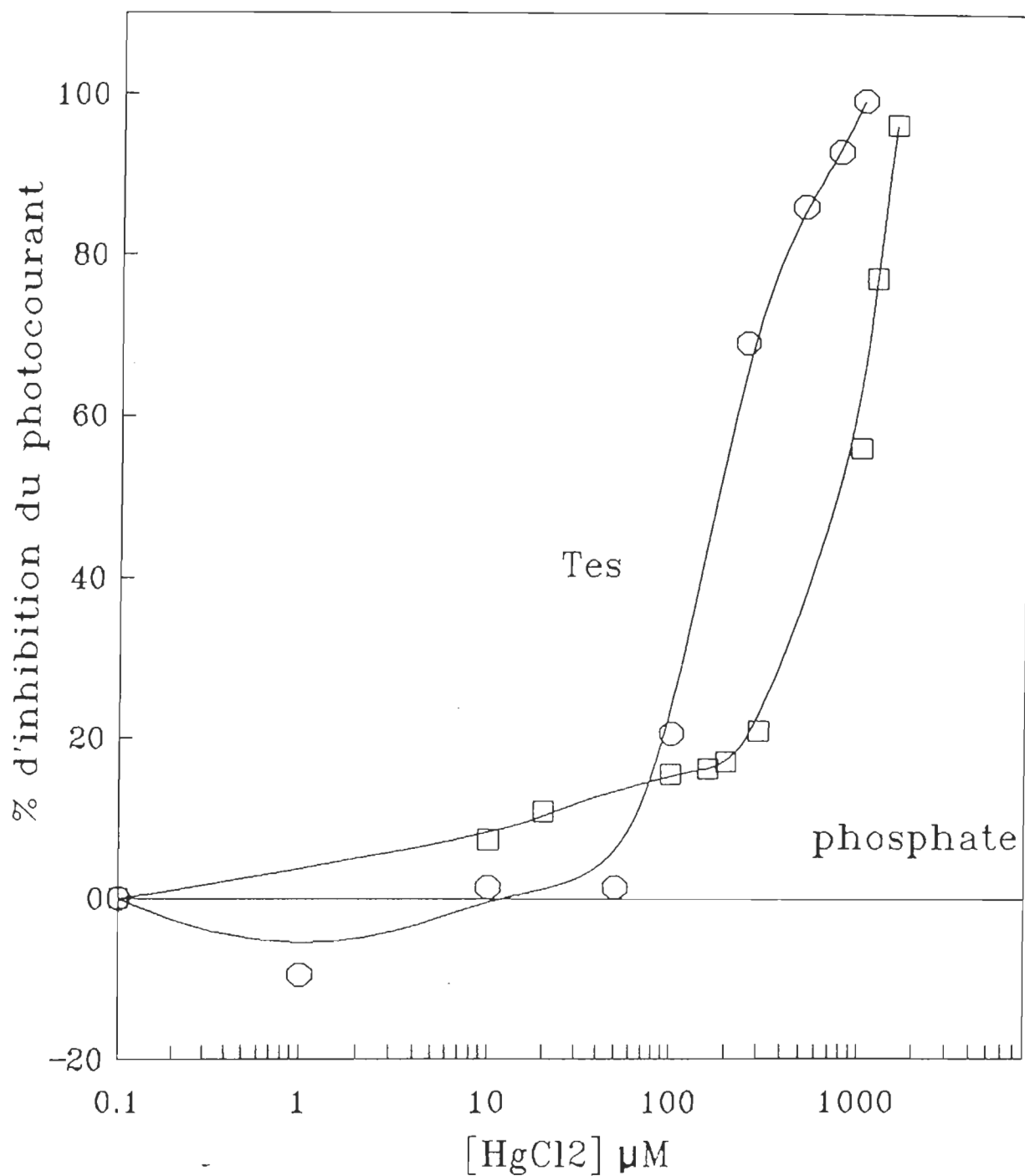


Figure 16. Pourcentage d'inhibition du photocourant selon la concentration de  $\text{HgCl}_2$ , dans deux tampons différents, soit les tampons Tes et phosphate. L'inhibition est plus rapide dans un tampon Tes que dans un tampon phosphate. L'expérimentation a été effectuée à une concentration de Chl de 250  $\mu\text{g/ml}$ .



et Isawa, 1972), diminuant ainsi leur disponibilité pour l'inhibition. Un tel phénomène a bien été démontré par Renganathan et Bose (1990) où lors d'inhibition de l'activité du PSII par le cuivre, l'inhibition s'est avérée dépendante de la nature du tampon utilisé.

Certains tampons sont reconnus pour ne pas former de complexes avec les ions métalliques, tel que le tampon HEPES (Good et Isawa, 1972). Cependant, un tampon qui est adéquat et même supérieur dans un système ne l'est pas nécessairement dans un autre. Pour cette raison, compte tenu des nombreux produits chimiques à tester, il fut décidé de conserver le tampon Tes.

#### 3.2.4. Influence du temps d'exposition.

Comme mentionné dans l'introduction, l'exposition directe des membranes photosynthétiques aux toxiques entraîne des temps d'exposition courts, étant donnée entre autres l'absence de paroi cellulaire, des membranes plasmiques et chloroplasmiques et des phytochélatines caractéristiques à chaque espèce végétale. Cependant, nous avons voulu vérifier jusqu'à quel point la sensibilité des membranes pouvait être améliorée par une augmentation du temps d'exposition, et ce, dans les limites du temps de vie des thylacoïdes à l'obscurité et à la température de la pièce, soit de 20 à 30 min. En effet, le taux

de réactivité de certains toxiques avec les membranes thylacoïdiennes devrait être également augmenté par une prolongation du temps d'exposition, selon le temps de réaction du toxique concerné avec les membranes. Ce temps de réaction dépend du site d'inhibition de la substance dans la membranes et de sa capacité à l'atteindre rapidement.

Effectivement, ce temps de réaction s'est montré très rapide pour certaines substances telle que l'atrazine, et très lent pour d'autres telle que le DDT (Fig.17). Par conséquent, tel que démontré au tableau VI, une amélioration intéressante de la sensibilité à certains toxiques pourrait être obtenue en augmentant le temps d'exposition.

#### 3.2.5. Influence de la température.

Le taux de réactivité d'un toxique avec les membranes thylacoïdiennes devrait être également affecté par la température. Nous avons voulu vérifier cette hypothèse avec un herbicide, soit l'atrazine, et un métal lourd, soit le cuivre.

Les résultats attendus pour tous les toxiques étaient une amélioration de la sensibilité avec une augmentation de la température, et ce, pour trois raisons: i) une augmentation de la température entraîne un accroissement de l'énergie cinétique

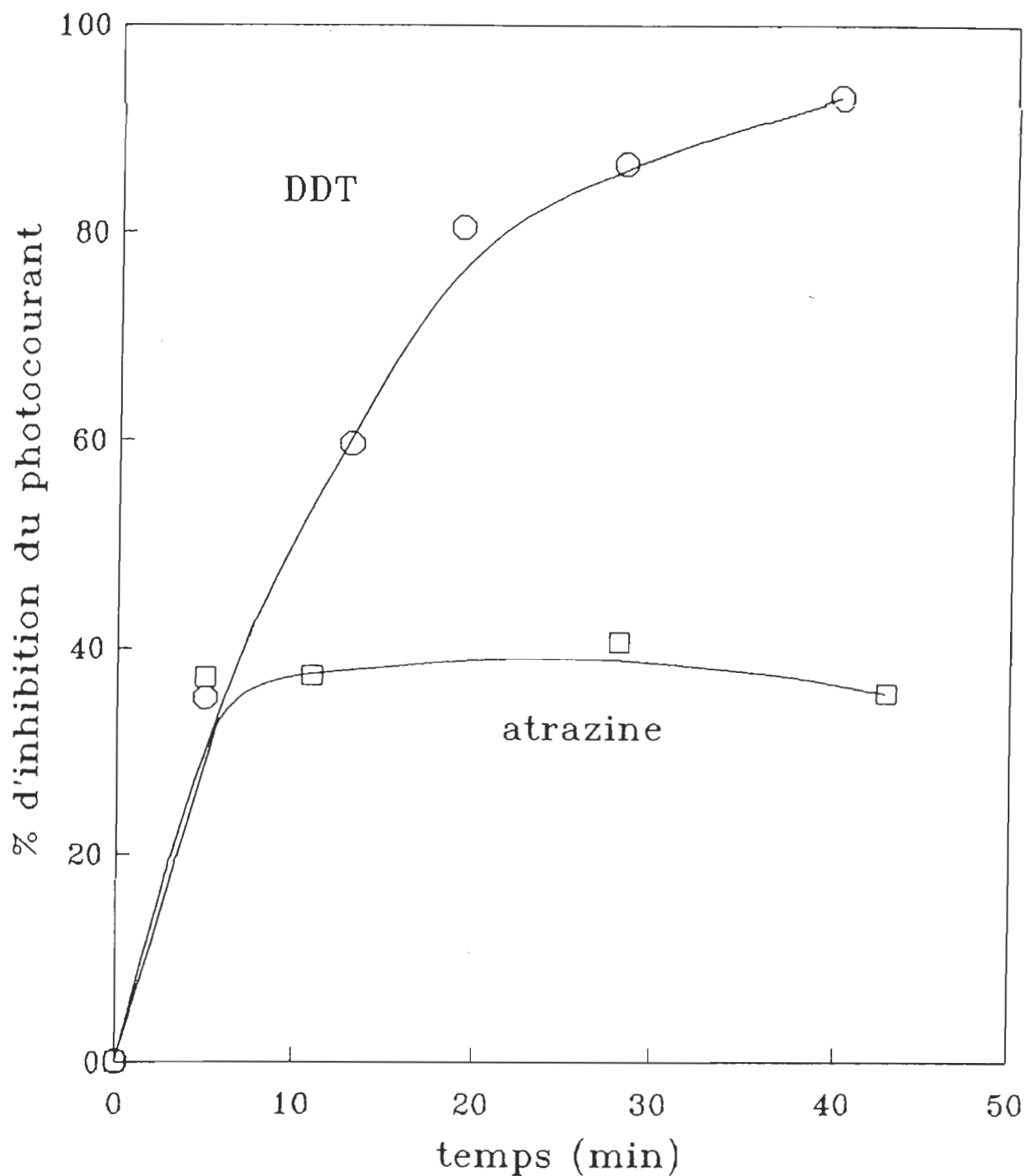


Figure 17. Détection du DDT ( $10^{-4}M$ ) et de l'atrazine ( $5 \times 10^{-6}M$ ) en fonction du temps d'exposition avec les thylacoïdes ( $20 \mu g$  Chl/ml). Le temps d'exposition optimal dépend du toxique étudié.

**Tableau VI.** Inhibition du photocourant par divers toxiques à des temps d'exposition de 5, 15 et 30 min. Une prolongation du temps d'exposition peut augmenter la sensibilité du biocapteur, selon le temps de réaction du toxique avec les thylacoïdes.

toxique (concentration en M)	Inhibition du photocourant (%) <sup>a</sup>			Fas <sup>b</sup>
	temps d'exposition (min)			
	5	15	30	
atrazine (5 x 10 <sup>-6</sup> )	37	37	40	1.08
diuron (10 <sup>-6</sup> )	85	81	79	0.93
bromoxynil (5 x 10 <sup>-5</sup> )	24	35	45	1.88
DDT (10 <sup>-4</sup> )	35	66	87	2.49
dieldrin (7.5 x 10 <sup>-4</sup> )	10	25	25	2.50
pentachloro (10 <sup>-4</sup> )	38	45	50	1.32
Pb(10 <sup>-4</sup> )	12	27	30	2.50
Zn (10 <sup>-4</sup> )	10	13	16	1.60
Cd (10 <sup>-3</sup> )	44	56	72	1.64
SDS (10 <sup>-4</sup> )	32	71	80	2.50
dioxane (1.17 x 10 <sup>-1</sup> )	17	26	35	2.06

<sup>a</sup>: toutes les mesures ont été effectuées à 20 ug Chl/ml sauf pour le dioxane (250 ug/ml).

<sup>b</sup>: Fas = facteur d'augmentation de la sensibilité  
=  $CI_{50} \text{ 30 min} / CI_{50} \text{ 5 min}$

des molécules, par conséquent de la fréquence des rencontres entre les molécules inhibitrices et leurs sites d'action; ii) une augmentation de la température conduit à un accroissement de la fluidité des membranes, ce qui pourrait augmenter leur perméabilité; iii) une augmentation de la température peut engendrer des changements conformationnels aux protéines du site de liaison ou proches de ce site, changements qui pourraient affecter l'accessibilité au site. Ce dernier facteur peut par contre provoquer également une baisse de sensibilité.

C'est ce qu'ont confirmé les résultats obtenus avec le Cu, mais non avec l'atrazine. Pour le cuivre (Fig.18), la sensibilité augmente avec une augmentation de la température, tandis que pour l'atrazine (Fig.19) la sensibilité augmente avec une diminution de la température. L'absence de recouvrement entre les différentes valeurs de  $CI_{50}$  avec leur intervalle de confiance à 95% respectif, présentés au tableau VII et VIII, indique bien que ces écarts de température affectent directement et significativement les valeurs de  $CI_{50}$ .

Les résultats avec l'atrazine peuvent probablement s'expliquer par le fait qu'une diminution de la température provoque un accroissement de la disponibilité et de l'accessibilité à son site d'action, soit le site Qb (Chapman et Barber, 1990).

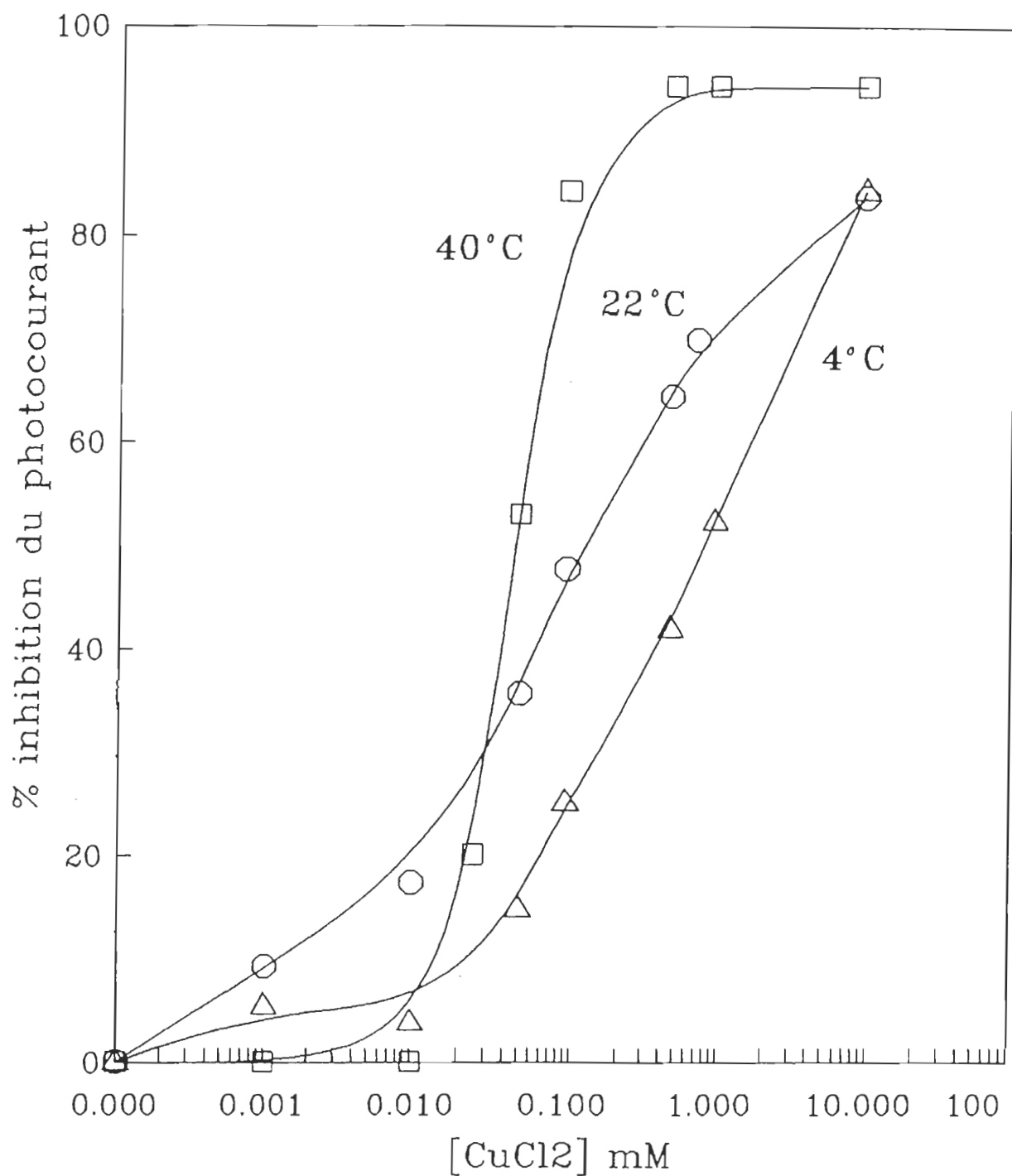


Figure 18. Détection du Cu ( $\text{CuCl}_2$ ) à différentes températures:  $(-\triangle-)$ ,  $4^\circ\text{C}$ ;  $(-\bigcirc-)$ ,  $22^\circ\text{C}$ ;  $(-\square-)$ ,  $40^\circ\text{C}$ . La sensibilité augmente avec l'augmentation de la température. L'expérimentation a été effectuée à une concentration de Chl de  $250\text{ }\mu\text{g/ml}$ .

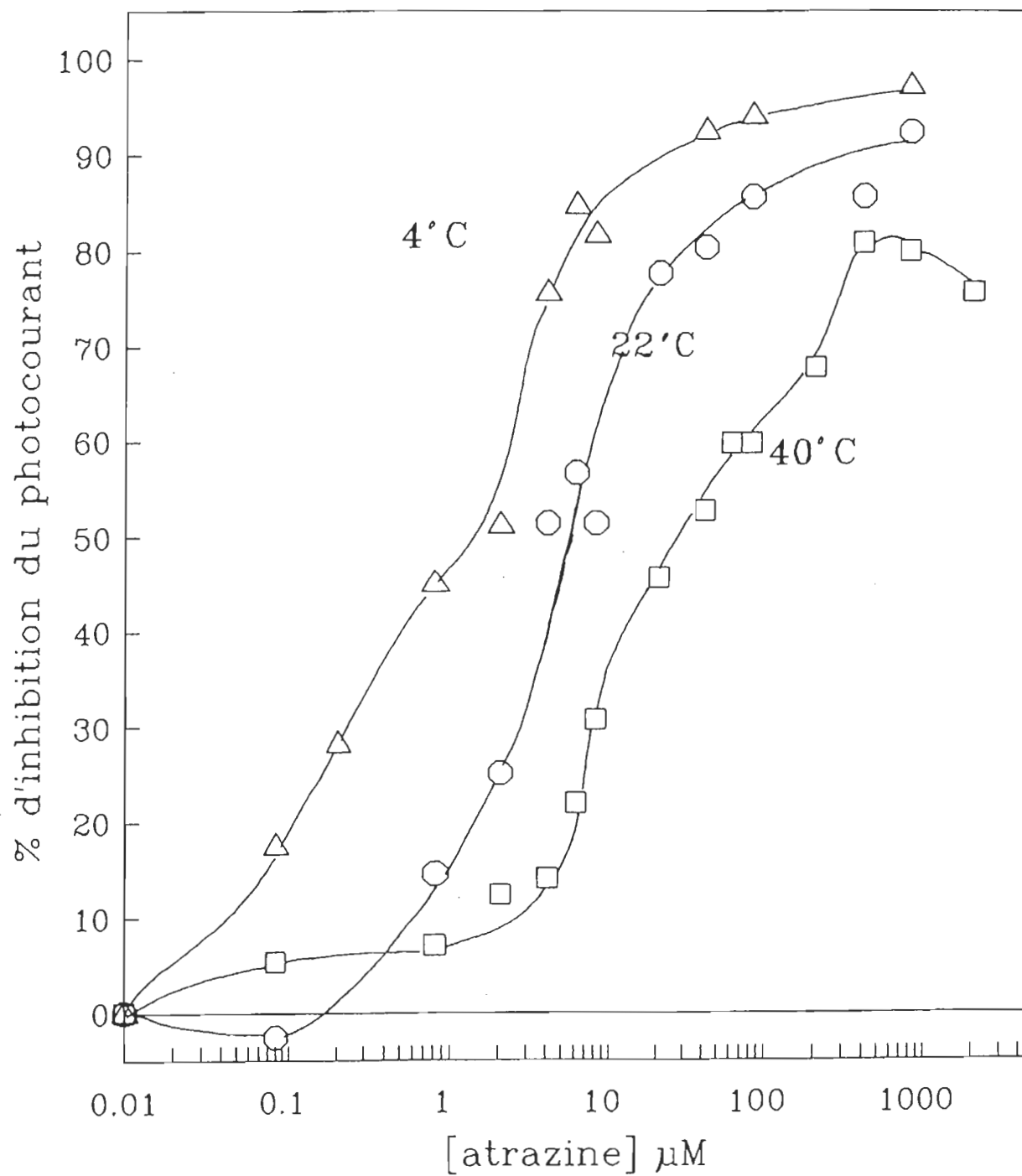


Figure 19. Détection de l'atrazine à différentes températures:  $(-\triangle-)$ , 4°C;  $(-\circ-)$ , 22°C;  $(-\square-)$ , 40°C. La sensibilité augmente avec la diminution de la température. L'expérimentation a été effectuée à une concentration de Chl de 20  $\mu\text{g/ml}$ .

Tableau VII.  $CI_{50}$  avec intervalles de confiance à 95% obtenus par analyse probit pour le cuivre à différentes températures.

température (°C)	$CI_{50}$ ( $\mu M$ )	intervalle de confiance 95%
4	649	486 - 863
22	120	64 - 180
40	48	43 - 55

Tableau VIII.  $CI_{50}$  avec intervalles de confiance à 95% obtenus par analyse probit pour l'atrazine à différentes températures.

température (°C)	$CI_{50}$ ( $\mu M$ )	intervalle de confiance 95%
4	1.0	0.7 - 1.4
22	6.8	5.1 - 9.1
40	43.3	32.8 - 57.2



En effet, à basses températures, le transport d'électrons étant plus lent compte tenu de l'augmentation de la viscosité des membranes, le site Qb est donc plus longtemps disponible, la plastoquinone se mouvant également plus lentement. Le site Qb étant situé sur la face externe de la membrane thylacoïdienne près du stroma (Ducruet et al., 1990), on peut supposer qu'à basses températures, la molécule d'atrazine rejoint ce site plus rapidement que la plastoquinone, ayant une plus courte distance à parcourir en milieu lipidique.

De plus, selon Lehoczeki et al. (1985), les plants résistants aux triazines démontrent une plus grande fluidité de la matrice lipidique des membranes que les plants sensibles. Cet accroissement de la fluidité est relié à une augmentation de l'insaturation des acides gras constitutants. Ainsi, selon ces auteurs, l'environnement lipidique des thylacoïdes, en plus de modifier la structure primaire de Qb, pourrait contrôler l'accessibilité des herbicides triazines à leur site de liaison sur la protéine Qb. Probablement qu'une augmentation de la température, en augmentant artificiellement la fluidité des membranes, reproduit en partie les conditions favorisant la résistance aux triazines. Ainsi, la sensibilité à l'atrazine augmente plutôt avec une diminution de la température, malgré une diminution de l'énergie cinétique des molécules.

### 3.2.6. Influence de l'espèce végétale dont sont extraits les membranes thylacoïdiennes.

Comme mentionné dans l'introduction, l'exposition directe des membranes photosynthétiques devrait faire disparaître les facteurs de différences de sensibilité aux toxiques entre espèces végétales, pour ne laisser que ceux inhérents à la membrane photosynthétique elle-même. Il nous a semblé intéressant de vérifier la réponse de thylacoïdes d'autres espèces végétales, facilement et rapidement disponibles et extractibles, soit ceux extraits de feuilles d'orge et de tomate, et ce, avec un herbicide, l'atrazine, et un métal lourd, le cuivre.

Les résultats (Fig.20 et 21) montrent que malgré des différences de sensibilité, les thylacoïdes isolés d'espèces variées peuvent être utilisés comme biocapteur. Cependant, l'espèce la plus sensible vis-à-vis un toxique ne l'est pas nécessairement vis-à-vis un autre. En effet, comme en témoignent les figures 20 et 21, les thylacoïdes d'orge sont les plus sensibles pour ce qui est de l'atrazine, mais les moins sensibles pour ce qui est du cuivre, tandis que c'est complètement l'inverse pour les thylacoïdes de plant de tomates. A remarquer que, selon l'analyse probit (Tableaux IX et X), ces différences de sensibilité semblent significatives pour ce qui

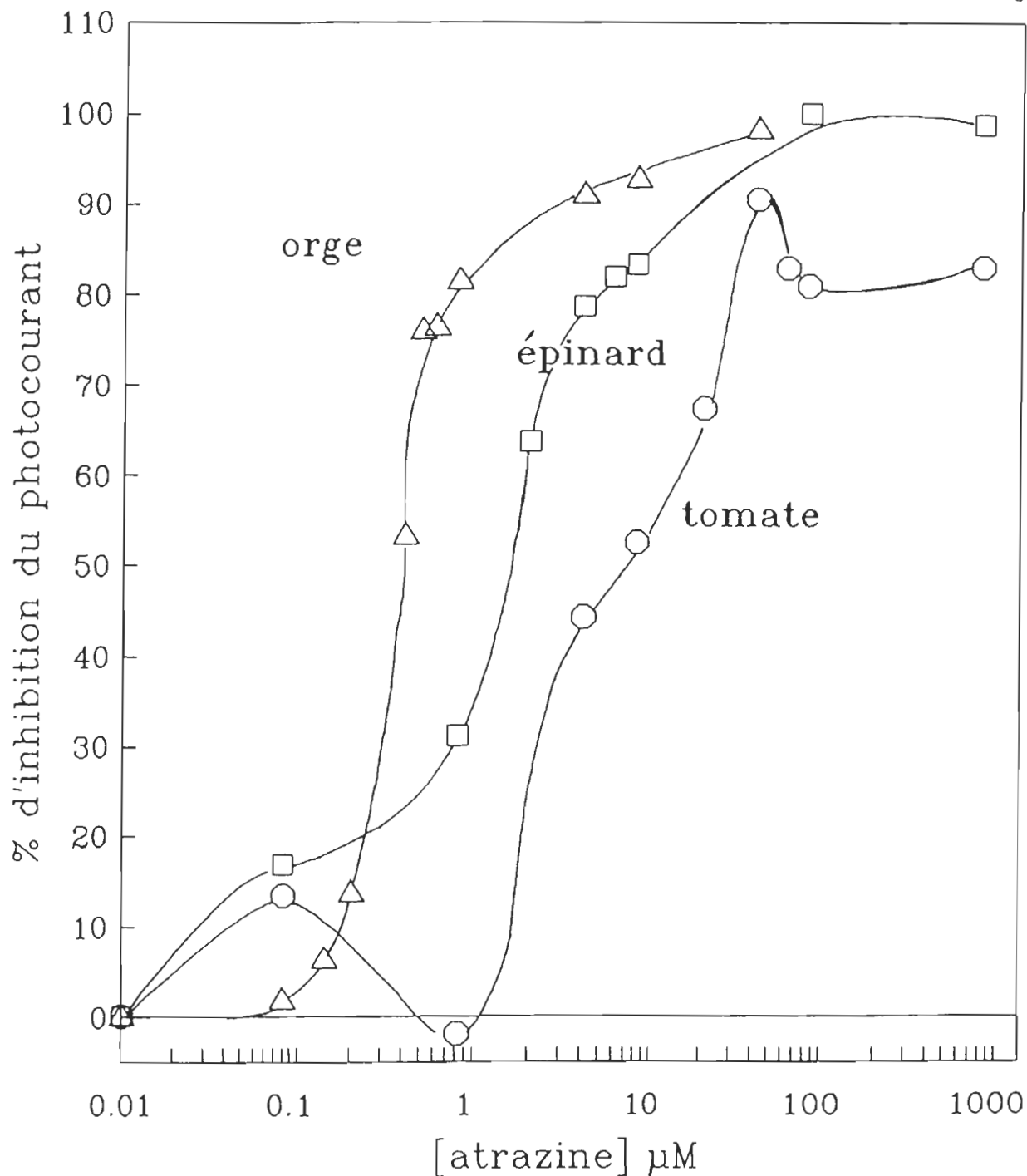


Figure 20. Détection de l'atrazine par des thylacoïdes extraits de feuilles d'épinard (-□-), d'orge (-△-) et de tomate (-○-). Malgré les différences de sensibilité, les thylacoïdes extraits d'espèces variées peuvent détecter la présence d'atrazine. L'expérimentation a été effectuée à une concentration de Chl de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

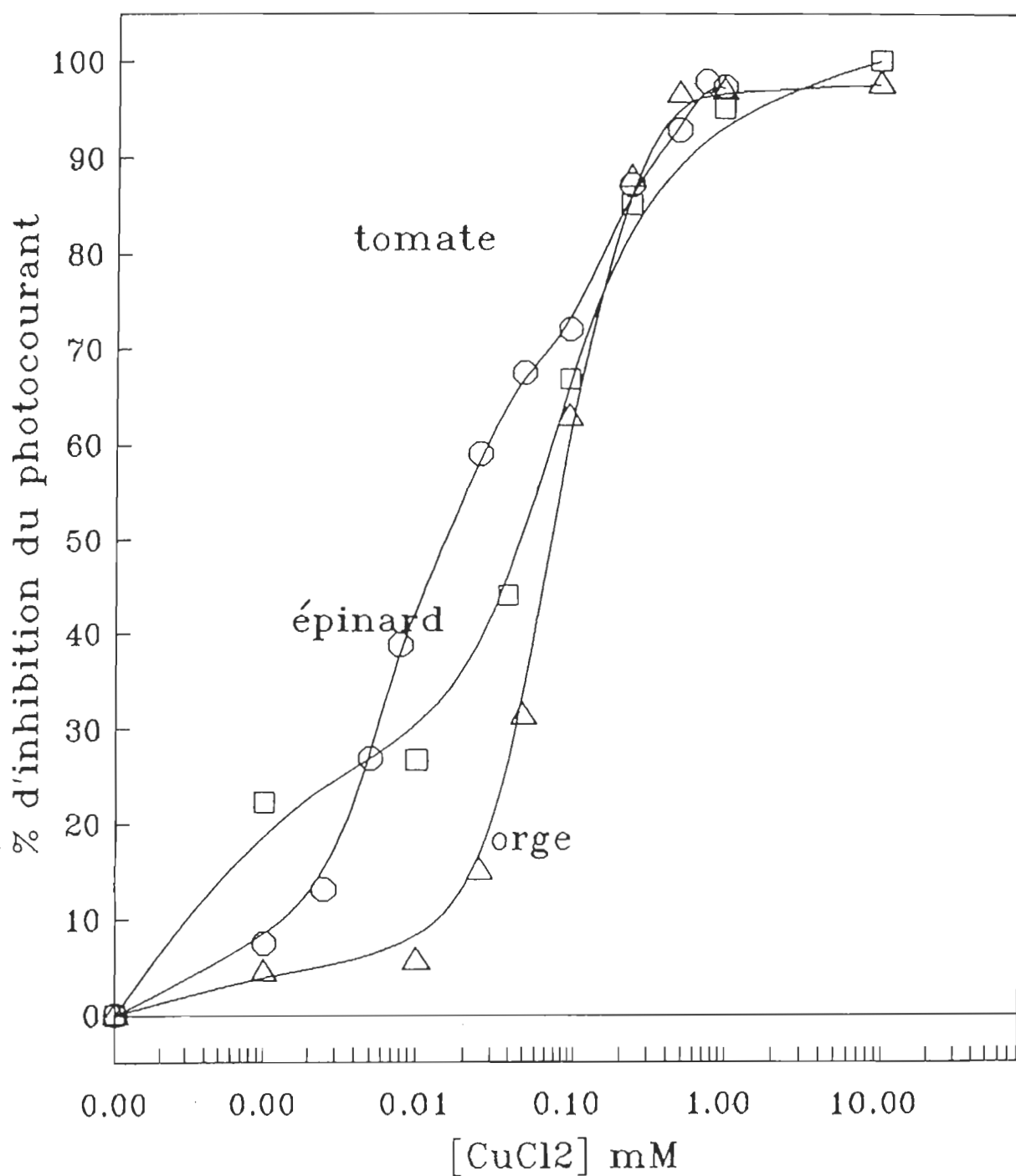


Figure 21. Détection du Cu ( $\text{CuCl}_2$ ) par des thylacoïdes extraits de feuilles d'épinard (-□-), d'orge (-△-) et de tomate (-○-). Malgré les différences de sensibilité, les thylacoïdes extraits d'espèces variées peuvent détecter la présence de Cu. L'expérimentation a été effectuée à une concentration de Chl de 20  $\mu\text{g/ml}$ .

Tableau IX.  $CI_{50}$  de l'atrazine avec intervalles de confiance à 95% obtenus par analyse probit avec des thylacoïdes de différentes espèces (données de la figure 20).

espèce	$CI_{50}$ ( $\mu M$ )	intervalle de confiance 95%
orge	0.4	0.3 - 0.7
épinard	1.7	1.3 - 2.2
tomate	7.0	5.6 - 8.8

Tableau X.  $CI_{50}$  du Cu avec intervalles de confiance à 95% obtenus par analyse probit avec des thylacoïdes de différentes espèces (données de la figure 21).

espèce	$CI_{50}$ ( $\mu M$ )	intervalle de confiance 95%
orge	46.7	35.4 - 61.5
épinard	44.5	32.5 - 61.0
tomate	22.3	17.2 - 28.7

est de l'inhibition par l'atrazine, mais non par le cuivre. Ces différences de sensibilité sont probablement inhérentes à la membrane photosynthétique elle-même; différences dans la composition et l'arrangement des constituants thylacoïdiens, modifications des protéines. Ces différences entraînent une augmentation ou une diminution de l'accès aux sites d'inhibition spécifiques à chaque toxique, et/ou une augmentation ou une diminution de l'affinité du toxique pour son site d'action.

### 3.3 Caractérisation et comparaison avec d'autres bioessais de la réponse des thylacoïdes à divers toxiques.

Les substances toxiques ont été choisies selon l'importance de leur présence dans le milieu aquatique du Québec (Environnement Canada, 1990), et l'existence de données toxicologiques à leur sujet.

Nous avons comparé toutes les valeurs de  $CI_{50}$  obtenues avec le bioessai à base de membranes photosynthétiques d'épinard avec celles d'autres bioessais basés sur la photosynthèse mais effectués sur des organismes entiers, soient différentes algues et cyanobactéries, lorsque ces données existent. Le choix de ces organismes est basé sur le fait qu'ils sont photosynthétiques et qu'ils vivent dans les écosystèmes aquatiques; en effet, c'est sur eux que l'on veut extrapoler les données de toxicité

obtenues avec notre bioessai *in vitro*, afin d'en vérifier la pertinence en tant que test de prébalayage représentatif de la réponse des producteurs primaires aquatiques. De plus, plusieurs cyanobactéries sont capables de fixer l'azote atmosphérique et sont des éléments majeurs du cycle de l'azote (Stratton, 1987).

Nous avons également voulu comparer nos valeurs de  $CI_{50}$  avec celles de bioessais reconnus, soit le Microtox<sup>MD</sup> (5 min) et la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) (96 h). Le Microtox est un bioessai basé sur le phénomène de bioluminescence de la bactérie marine *Photobacterium phosphoreum*. Lorsque cette bactérie est exposée à des substances toxiques, la quantité de lumière qu'elle émet est réduite proportionnellement à la toxicité de l'échantillon. Le test sur la truite arc-en-ciel est un test conventionnel de toxicité aiguë aquatique basé sur le taux de létalité des poissons, qui a valeur légale au Canada (Ribo et Kaiser, 1987). Cette comparaison avec des organismes d'un autre ordre phylogénique n'est présenté qu'à titre indicatif.

A remarquer que des différences dans les conditions expérimentales telles que l'espèce et la concentration des organismes exposés, le temps d'exposition, la formulation chimique du toxique étudié, la quantité et le temps d'exposition à la lumière, la température, la nature et le pH du tampon, la nature et la concentration des ions ajoutés, peuvent modifier de

façon appréciable la réponse des organismes exposés; la comparaison entre différents bioessais en est d'autant compliquée. Entre autres, les formes ionisées et non-ionisées d'un même composé démontrent habituellement une toxicité significativement différente. Le niveau d'ionisation dépend du pH de la solution et de la concentration des ions (Ribo et Kaiser, 1987).

L'espèce, le temps d'exposition et la formulation chimique du toxique étudié étant des conditions prépondérantes, des plus variables et généralement précisées, elles ont été indiquées dans les tableaux de comparaison. Mentionnons également que dans le cas particulier des pesticides, des changements mineurs dans la formulation chimique ou dans le solvant organique utilisé pour le dissoudre peuvent également affecter sérieusement le niveau d'inhibition (Livingston, 1977).

### 3.3.1. Pesticides.

Les pesticides sont devenus un important aspect de notre société moderne surtout à cause des bénéfices en agriculture et en santé publique entraînés par leur utilisation (Freedman, 1989). Leur contamination atteint les écosystèmes aquatiques et parfois l'eau potable, principalement à cause du lessivage des terres traitées. Mentionnons que, compte tenu de l'utilisation



massive des herbicides au Canada, la question de la phytotoxicité sur des plantes non visées est maintenant soulevée. Par conséquent, on considère aujourd'hui la possibilité d'exiger des tests sur des plantes non visées pour l'enregistrement des pesticides au Canada (St-Laurent et al., 1992).

Les pesticides comprennent différents groupes de produits chimiques qui peuvent être classés entre autres selon l'organisme nuisible visé. Dans cette étude, nous avons utilisé 4 herbicides (atrazine, simazine, diuron et bromoxynil), 2 insecticides (DDT et dieldrin) et un produit utilisé à la fois comme fongicide, insecticide et herbicide (pentachlorophénol).

#### 3.3.1.1. Herbicides.

Comme mentionné au chapitre 1.4, le PSII conduit le transfert d'électrons de l'eau au PSI par un système de transport qui comprend, entre autres, les quinones  $Q_a$  et  $Q_b$ ;  $Q_a$  une quinone solidement liée, transfère l'électron à  $Q_b$ , une quinone faiblement liée (Ohad et Hirschberg, 1990). Plusieurs herbicides chimiquement différents inhibent le transport d'électrons dans le PSII en bloquant le transfert d'électrons entre  $Q_a$  et  $Q_b$ , et aussi possiblement en ralentissant le complexe de dégagement de l'oxygène. Ces herbicides comprennent les

dérivés de la triazine (ex. atrazine, simazine), de l'urée (ex. diuron), de l'uracil (ex. bromacil) et du phénol (ex. bromoxynil) (Chapman et Barber, 1989). Ils agissent en déplaçant  $Q_b$  de son site de liaison. Des expériences de compétition ont démontré que ces herbicides partagent des déterminants de liaison communs sur ce site (Vermaas et al., 1984). Ce dernier est localisé sur la protéine D1, qui est une composante du PSII, sur la face externe de la membrane thylacoïdienne près du stroma, mais dans un environnement protéique hydrophobique (Pfister et al., 1981; Ducruet et al., 1990). Cependant, tout en se recouvrant partiellement, les domaines de liaison des différents herbicides sur la protéine D1 seraient néanmoins distincts (Wildner et al., 1990).

Ainsi, la majeure partie des dommages causés par ces herbicides à la lumière peut être expliquée par la génération de radicaux libres, conséquence du blocage de la réduction de la quinone (formation de chlorophylles triplets  $\rightarrow$  oxygène singulets  $\rightarrow$  radicaux libres) (Chapman et Barber, 1989).

Malgré leur mode d'inhibition identique, plusieurs facteurs peuvent expliquer les différences de sensibilité face aux membranes thylacoïdiennes, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, observées entre les herbicides atrazine, simazine, diuron et bromoxynil (Tableau XI). Premièrement, ces herbicides peuvent

Tableau XI. Comparaison de la réponse à différents herbicides du bioessai à base de membranes photosynthétiques d'épinard (20 µg/ml; 5 min) avec celle d'autres bioessais basés sur la photosynthèse avec des organismes entiers, soit différentes espèces d'algues et de cyanobactéries.

herbicide	épinard cellule	autres méthodes basées sur photosynthèse		
	CI <sub>50</sub> ppm (µM)	CI <sub>50</sub> ppm (µM)	espèce	temps d'exposition
atrazine	0.37 (1.7)	0.5 (2.32)	<u>Chlorella</u>	3 h
			<u>Pyrenoidosa</u> <sup>a</sup>	
		0.3 (1.40)	<u>Scenedesmus</u>	3 h
			<u>quadricauda</u> <sup>a</sup>	
		0.5 (2.32)	<u>Anabaena</u>	3 h
			<u>cylindrica</u> <sup>a</sup>	
		0.3 (1.40)	<u>A. inaequalis</u> <sup>a</sup>	3 h
simazine	0.22 (1.1)	0.1 (0.46)	<u>A. variabilis</u> <sup>a</sup>	3 h
		0.02 (0.1)	<u>Aphanocapsa sp.</u> <sup>b</sup>	---
		0.06-0.16 (0.28-0.74)	algues vertes <sup>c</sup>	1 h
		0.77 (3.8)	<u>Caldophora</u>	5 min
			<u>glomerata</u> <sup>d</sup>	
diuron	0.11 (0.45)	0.61 (3.0)	<u>Pithophra</u>	5 min
			<u>oedogonia</u> <sup>d</sup>	
		0.22 (1.1)	<u>Spirogyra</u>	5 min
			<u>jurgensii</u> <sup>d</sup>	
bromo- xynil	13.4 (48.4)	0.95 (4.7)	<u>Ankistrodesmos</u>	5 min
			<u>brainii</u> <sup>d</sup>	
		0.02-0.17 (0.09-0.73)	diatomées <sup>c</sup>	1 h
		0.01-0.04 (0.04-0.17)	algues vertes <sup>c</sup>	1 h
bromo- xynil	13.4 (48.4)	0.02 (0.1)	<u>Dunaliella</u>	15 min
			<u>tertiolecta</u> <sup>e</sup>	
bromo- xynil	13.4 (48.4)	2.5-3.2 (9.03-11.55)	<u>Selenastrum</u>	96 h
			<u>capricornutum</u> <sup>f</sup>	

<sup>a</sup> Stratton, 1984.

<sup>c</sup> Hollister et Walsh, 1973.

<sup>e</sup> Overnell, 1976.

<sup>b</sup> Allen et al., 1982.

<sup>d</sup> O'Neal et Lembi, 1983.

<sup>f</sup> St-Laurent et al., 1992.

entrer dans la poche de Qb via les lipides membranaires, ou, plus improbablement, par la partie externe de la protéine D1 près du stroma (Ducruet et al., 1990). Plus l'herbicide est liposoluble, plus il devrait rejoindre facilement son site d'action. Deuxièmement, différentes étapes limitantes dans le processus de liaison peuvent se produire; par exemple, un réarrangement conformationnel plus ou moins lent de la protéine du site de liaison, ou de la molécule d'inhibiteur, peut constituer un prérequis à la formation de la liaison (Ducruet et al., 1990). Troisièmement, d'autres composantes du PSII peuvent possiblement affecter l'interaction avec l'herbicide: des protéines (autres que D1) proches du site de liaison de l'herbicide, et/ou la composition en lipides (Chapman et al., 1985; Chapman et Barber, 1989).

Finalement, mentionnons que le bromoxynil, en tant que dérivé phénolique, constitue une classe à part. En effet, le mode d'inhibition de ce type d'herbicide est plus complexe étant donné qu'il démontre plusieurs autres sites de liaison sur le PSII. Cependant, son temps de réaction avec la membrane thylacoïdienne serait plus lent (Ajlan et al., 1989). Ce phénomène a également été observé dans nos résultats (tableau VI); contrairement à l'atrazine et au DCMU, un temps d'exposition de 5 min est insuffisant pour obtenir l'inhibition maximale avec le bromoxynil. De plus, la complexité de

l'inhibition par les dérivés phénoliques serait augmentée par les effets du pH. En effet, une expérience avec l'ioxynil, un autre dérivé phénolique, a démontré que le pH influence fortement le temps de liaison de cet herbicide aux thylacoïdes d'épinard; les sites de liaisons semblaient être accessibles seulement aux molécules non chargées ( $pK$  ioxynil = 3.96) et l'affinité semblait également modifiée par les charges des récepteurs autour des sites de liaison (Thiel et Boger, 1986). Comme nous avons travaillé exclusivement à un pH de 7.5, et que le  $pK$  du bromoxynil est de 4.6, ce facteur a probablement également joué en défaveur de la sensibilité au bromoxynil.

A remarquer qu'à l'exception du bromoxynil, toutes les valeurs de  $CI_{50}$  du bioessai à base de membranes photosynthétiques d'épinard sont comparables à celles obtenues avec d'autres bioessais basés sur la photosynthèse mais effectués sur des organismes entiers, soient différentes algues et cyanobactéries, et ce, avec un temps d'exposition beaucoup plus court (Tableau XI). L'ordre de sensibilité est également comparable, soit: diuron > atrazine = simazine > bromoxynil. Ces résultats sont concordants avec le fait qu'il existerait chez les plantes supérieures une remarquable conservation de la séquence des acides aminés de la protéine D1 du PSII (site des domaines de liaisons des herbicides), soit 98% d'homologie, et également chez toutes les espèces contenant un PSII, soit 85 à 90%

d'homologie (Ohad et Hirschberg, 1990). Les résultats de Allen et al. (1982) vont dans le même sens, en indiquant que les  $CI_{50}$  des herbicides diuron et atrazine pour l'activité photosynthétique des membranes thylacoïdiennes d'épinards et de l'algue *Aphanocapsa* 6308 sont similaires, donc que leur affinité pour le site de liaison est comparable.

Ce résultat un peu plus élevé que nous avons obtenu avec le bromoxynil peut facilement s'expliquer par l'énorme différence des temps d'exposition effectués, soit 5 min pour notre bioessai et 96 h pour celui avec l'algue *Selenastrum capricornutum*. De plus, comme mentionné ci-haut, le temps de réaction du bromoxynil avec la membrane thylacoïdienne est long (environ 60 min selon Thiel et Böger, 1986); un temps d'exposition de 5 min est donc insuffisant pour obtenir une inhibition maximale avec ce toxique.

Pour ce qui est de la comparaison avec le Microtox et la truite arc-en-ciel par rapport aux herbicides étudiés, seules quelques données sur l'atrazine et la simazine sont disponibles. L'atrazine serait très peu toxique pour les poissons (Cossarini-Dunier et al., 1988), et la simazine également; la  $CL_{50}$  (concentration létale pour 50% des poissons) 96 h de cette dernière pour la truite arc-en-ciel serait supérieure à 100 ppm (Pauli et al., 1991). Aucune inhibition par l'atrazine n'a pu

être détectée sur le Microtox<sup>MD</sup> jusqu'à 50 ppm (0.23 mM) après une exposition de 30 min (Roberts et al., 1990).

#### 3.3.1.2. Insecticides.

Les modes d'inhibition des insecticides sur la photosynthèse sont en général un sujet peu couvert dans la littérature scientifique.

Moreland et Novitzky (1984) ont démontré que le DDT et la dieldrin inhibent le transport d'électrons chez des thylacoïdes d'épinard; ces insecticides semblaient interagir, comme certains herbicides, avec le site Qb. Chez le seigle, Akbar et Rogers (1985) ont démontré deux sites d'action pour le DDT avec la chaîne de transport d'électrons photosynthétique; le premier site serait situé du côté oxidant du PSII et le second, dans la chaîne de transport intermédiaire entre le PSII et le PSI, soit du côté oxidant du PSI. Owen et al. (1977) ont observé des résultats similaires chez l'orge.

Les valeurs de  $CI_{50}$  obtenues pour le DDT et la dieldrin avec les thylacoïdes d'épinard sont de même ordre de grandeur que celles obtenues par d'autres bioessais basés sur la croissance effectués avec des algues et des cyanobactéries (aucune donnée relative à la photosynthèse disponible) (Tableau XII).

Tableau XII. Comparaison de la réponse à différents insecticides du bioessai à base de membranes photosynthétiques d'épinard (20 µg/ml; 5 min) avec celle d'autres bioessais basés sur la croissance avec différentes espèces d'algues et de cyanobactéries.

insecticide	épinard cellule	autres méthodes basées sur la croissance	
	CI <sub>50</sub> ppm (µM)	CI <sub>50</sub> ppm (µM)	espèce
DDT	151 (427)	100 (282)	<u>Anabaena</u>
			<u>variabilis</u> <sup>a</sup>
		100 (282)	<u>Aphanocapsa</u>
			6308 <sup>a</sup>
		50 (141)	<u>Nostoc sp.</u> <sup>a</sup>
dieldrin	309 (813)	>100 (>263)	<u>Ankistrodesmus</u>
			<u>braunii</u> <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Hutber et al., 1979.



Pour ce qui est de la comparaison avec le bioessai Microtox<sup>MD</sup> (Tableau XIII), la détection des insecticides DDT et dieldrin par les thylacoïdes d'épinard est beaucoup plus sensible, aucune toxicité significative n'ayant été détectée par le Microtox<sup>MD</sup>. Par contre, la sensibilité du Microtox<sup>MD</sup> pour le pentachlorophénol (PCP) est beaucoup plus élevée que celle des thylacoïdes d'épinard.

La truite arc-en-ciel s'avère des plus sensibles envers les 3 insecticides étudiés, en particulier pour ce qui est du DDT et de la dieldrin; d'ailleurs ces insecticides sont reconnus comme des poisons neurologiques puissants (Klaassen et al., 1986). La réponse des thylacoïdes d'épinard à ces insecticides, tout comme celle des algues et des cyanobactéries, démontre une sensibilité très faible à comparer avec la truite.

### 3.3.2. Métaux lourds.

A cause de leur présence de plus en plus importante dans l'environnement, de leur persistance et de leur toxicité étendue à l'ensemble du biotope, les métaux lourds ont une place prépondérante en recherche écotoxicologique. Certains métaux lourds comme le cuivre et le zinc sont considérés comme des éléments essentiels aux organismes végétaux et sont impliqués dans de nombreux processus métaboliques; d'autres, comme le mercure, le plomb et le cadmium, n'ont aucune fonction

Tableau XIII. Comparaison de la réponse à différents insecticides du bioessai à base de membranes photosynthétiques d'épinard (20  $\mu\text{g/ml}$ ) avec celle d'autres bioessais reconnus, soit le Microtox<sup>MD</sup> et la truite arc-en-ciel.

insecticide	ppm ( $\mu\text{M}$ )		
	épinard cellule 5 min $\text{CI}_{50}$	Microtox 5 min $\text{CI}_{50}$	poisson 96 h $\text{CL}_{50}$
DDT	151 (427)	no <sup>c</sup>	0.0001 (0.05) <sup>a</sup>
dieldrin	309 (813)	no <sup>c</sup>	0.0001 (0.05) <sup>a</sup>
PCP	27.5 (103)	0.5 <sup>b</sup>	0.24 (0.9) <sup>a</sup>

no: pas de toxicité significative observée

<sup>a</sup> Knobeloch et al., 1990.

<sup>b</sup> Ribo et Kaiser, 1987.

<sup>c</sup> Miller et al., 1985.

biologique connue. Cependant, des concentrations excessives de tous les métaux lourds sont toxiques aux systèmes biologiques (Stratton, 1987).

Comme mentionné dans l'introduction, la nécessité d'effectuer des bioessais vient entre autres du fait que l'analyse chimique ne permet pas de prévoir les différentes interactions entre les divers produits présents. Ce phénomène s'illustre bien avec les métaux; en effet, les effets interactifs des métaux sur les organismes aquatiques sont très complexes. Pour un résumé des interactions de la combinaison de certains métaux sur les algues voir Rai et al. (1981) et Stratton (1987). Ne soulignons ici que l'expérimentation de Wong et al. (1982), qui a démontré qu'un mélange de 10 métaux (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Hg, Ni, Se et Zn), préparé selon les normes édictées par les objectifs de qualité de l'eau pour les Grands Lacs pour chaque métal utilisé individuellement, réduisait significativement la productivité primaire de 4 cultures d'algues d'eau douce (*Scenedesmus*, *Chlorella*, *Anabeana* et *Navicula*) aussi bien que celle du phytoplancton naturel de l'eau du lac Ontario.

De plus, dans toute étude toxicologique impliquant en particulier des métaux lourds, l'expérimentateur doit tenir

compte également de certains autres facteurs physico-chimiques qui ont un contrôle sur l'action toxique de ces produits, i.e, leur concentration, la présence d'autres anions et cations, le pH, la température et la présence de matière organique. (Bitton, 1983). Tous ces facteurs déterminent la spéciation du métal. La spéciation est la proportion dans laquelle il se présente sous forme d'ions libres, de complexes (liés à ligands organiques ou inorganiques), et/ou absorbés aux particules (Laegreid et al., 1983). Par exemple, un ion métallique peut réagir avec plusieurs autres ions pour former un sel insoluble ne pouvant interagir avec les membranes thylacoïdiennes. Cette formation d'un complexe insoluble avec un ion métallique dépend également de la quantité et de l'espèce du contre-ion impliqué dans la réaction (Cotton et Wilkinson, 1988).

#### 3.3.2.1. Mercure.

Le mercure est un des métaux lourds les plus omniprésents dans l'environnement. On le retrouve naturellement dans la croûte terrestre et est également présent à faibles concentrations dans la biosphère. Les sources anthropogéniques de mercure dans la biosphère comprennent des sources industrielles, pharmaceutiques et agricoles (pesticides) (OCDE, 1974).

Il est généralement admis que le principal site d'inhibition par le mercure dans la chaîne de transport d'électrons photosynthétique est localisé au niveau du PSI, affectant la plastocyanine (Trebst, 1980; Murthy et al., 1988) et l'enzyme NADP-ferrodoxine oxydo-réductase (DeFilippis et al., 1981). Cependant, d'autres sites d'inhibition sont observés par différents auteurs. Par exemple, Kojima et al. (1987) ont démontré que l'exposition de thylacoïdes d'épinard et d'*Anacystis nidulans* à différents composés mercuriques détruisait les complexes fer-soufre du PSI.

De plus, le PSII serait également sensible au mercure. Les résultats de Murthy et al. (1988) indiquent que le mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) inhibe le transport d'électrons à plus d'un site chez la cyanobactérie *Spirulina platensis*; à faible concentration de  $\text{HgCl}_2$  (6  $\mu\text{M}$ ) un premier site d'inhibition apparaît effectivement être au niveau de la plastocyanine; cependant, à une concentration un peu plus élevée de mercure (15-18  $\mu\text{M}$ ), un second site d'inhibition fut observé près du PSII. De Fillipis et al. (1981), ont suggéré que chez *Euglena*, en plus de légèrement affecter l'enzyme NADP ferrodoxine oxydoréductase, le mercure affecterait le complexe de dégagement d'oxygène, et que ce dernier constituerait le principal site pour l'ensemble de la chaîne de transport d'électrons. Néanmoins, pour l'équipe de Singh et al. (1989), le site d'action du  $\text{Hg}^{2+}$  serait plutôt

localisé avant ou dans le complexe du cytochrome b-f, possiblement après le niveau de la cytochrome réductase.

La sensibilité du bioessai à base de membranes photosynthétiques d'épinard pour le Hg est comparable à celle démontrée par d'autres bioessais basés sur la photosynthèse, mais effectués sur des algues et des cyanobactéries entières (Tableau XIV). Les valeurs de toxicité du Hg pour la photosynthèse des algues et des cyanobactéries s'étendent de quelques ppb à quelques ppm; notre  $CI_{50}$  est à quelques ppm, et ce dans un temps d'exposition généralement plus court.

Cependant, comme démontré à la figure 22, à faibles concentrations de Hg, avant que ne débute l'effet inhibiteur, nous avons observé une augmentation significative du photocourant. Cet effet est plus prononcé à faible concentration de Chl, probablement à cause d'un rapport Hg/site d'action plus favorable. Ce phénomène a également été observé chez des algues. Par exemple, DeFilippis et Pallaghy (1976) rapportent une augmentation dans le taux de dégagement d'oxygène aux faibles concentrations de mercure. Ils émettent l'hypothèse que cette augmentation peut être reliée à une diminution de la concentration de métaux lourds dans les cellules au fur et à mesure qu'elles se divisent, hypothèse inapplicable ici. Shieh and Barber (1973), Shaw et al. (1988), et Sahu et al. (1988)

Tableau XIV. Comparaison de la réponse à différents métaux lourds du bioessai à base de membranes photosynthétiques d'épinard (20 µg/ml; 5 min) avec celle d'autres bioessais basés sur la photosynthèse avec différentes espèces d'algues et de cyanobactéries.

métal lourd	épinard cellule	autres méthodes basées sur photosynthèse		
	CI <sub>50</sub> ppm (µM)	CI <sub>50</sub> ppm (µM)	espèce	temps d'exposition
Hg	1.6 (0.008)	20.1 (0.1)	<u>Dunaliella</u> <u>tertiolecta</u> <sup>c</sup>	15 min
		0.5 (0.0025)	<u>Skeletonema</u> <u>costatum</u> <sup>c</sup>	15 min
		0.4-0.6 (0.002-0.003)	<u>Phaeodactylum</u> <u>tricornutum</u> <sup>c</sup>	15 min
		8.02 (0.04)	<u>Brachiomonas</u> <u>submarina</u> <sup>c</sup>	15 min
		1.2 (0.006)	<u>Spirulina</u> <u>platensis</u> <sup>d</sup>	5 min
		3.2 (0.05)	<u>Skeletonema</u> <u>costatum</u> <sup>c</sup>	15 min
Cu	3.5 (0.055)	4.4 (0.07)	<u>Dunaliella</u> <u>tertiolecta</u> <sup>c</sup>	15 min
		4.4 (0.07)	<u>Attheya</u> <u>decora</u> <sup>c</sup>	15 min
		1.3-3.2 (0.02-0.05)	<u>Brachiomonas</u> <u>submarina</u> <sup>c</sup>	15 min
		>63.55 (>1) <sup>f</sup>	<u>Phaeodactylum</u> <u>tricornutum</u> <sup>c</sup>	15 min
		2.5 (0.04)	<u>Chlorella</u> <u>fusca</u> <sup>e</sup>	60 min

<sup>a</sup> Overnell, 1975.

<sup>b</sup> Irmer et al. 1986.

<sup>c</sup> Overnell, 1976. Cu = CuSO<sub>4</sub>  
Cd = Cd(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>  
Zn = ZnSO<sub>4</sub>

<sup>d</sup> Murthy et al., 1988.

<sup>e</sup> Wu et Lorenzen, 1984.

<sup>f</sup> Stratton, 1979a.

<sup>g</sup> Laegreid, 1983. Cd = CdSO<sub>4</sub>

<sup>h</sup> plus de 80% de l'activité du témoin à cette concentration

Tableau XIV. suite.

métal lourd	épinard cellule	autres méthodes basées sur photosynthèse		
	CI <sub>50</sub> ppm ( $\mu$ M)	CI <sub>50</sub> ppm ( $\mu$ M)	espèce	temps d'exposition
Pb	70.5 (0.34)	0.31 (0.0015)	<u>Chlamydomonas</u> <u>reinhardii</u> <sup>a</sup>	15 min
		1.04 (0.005)	<u>C. reinhardii</u> <sup>b</sup>	3 h
Cd	309 (2.75)	0.08-0.17 (0.00072-0.0015)	<u>Selenastrum</u> <u>capricornutum</u> <sup>f</sup>	24 h
		0.17 (0.0015)	<u>C. reinhardii</u> <sup>a</sup>	15 min
		1.0-2.0 (0.0088-0.0177)	<u>Anabaena</u> <u>inaequalis</u> <sup>g</sup>	2 h
		>112 (>1) <sup>‡</sup>	<u>Attheya</u> <u>decora</u> <sup>c</sup>	15 min
		>112 (>1) <sup>‡</sup>	<u>Brachiomonas</u> <u>submarina</u> <sup>c</sup>	15 min
		>112 (>1) <sup>‡</sup>	<u>Monochrysis</u> <u>lutheri</u> <sup>c</sup>	15 min
		>112 (>1) <sup>‡</sup>	<u>Skeletonema</u> <u>costatum</u> <sup>c</sup>	15 min
		1.3 (0.02) <sup>‡</sup>	<u>Monochrysis</u> <u>lutheri</u> <sup>c</sup>	15 min
		39 (0.6) <sup>‡</sup>	<u>Attheya</u> <u>decora</u> <sup>c</sup>	15 min
Zn	92 (1.4)	65 (1) <sup>‡</sup>	<u>Dunaliella</u> <u>tertiolecta</u> <sup>c</sup>	15 min
		>65 (>1) <sup>‡</sup>	<u>Phaeodactylum</u> <u>tricornutum</u> <sup>c</sup>	15 min
		>65 (>1) <sup>‡</sup>	<u>Skeletonema</u> <u>costatum</u> <sup>c</sup>	15 min

<sup>a</sup> Overnell, 1975.<sup>b</sup> Irmer et al. 1986.<sup>c</sup> Overnell, 1976. Cu = CuSO<sub>4</sub>  
Cd = Cd(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>  
Zn = ZnSO<sub>4</sub><sup>d</sup> Murthy et al., 1988.<sup>e</sup> Wu et Lorenzen, 1984.<sup>f</sup> Stratton, 1979a.<sup>g</sup> Laegreid, 1983. Cd = CdSO<sub>4</sub><sup>‡</sup> plus de 80% de l'activité du témoin à cette concentration



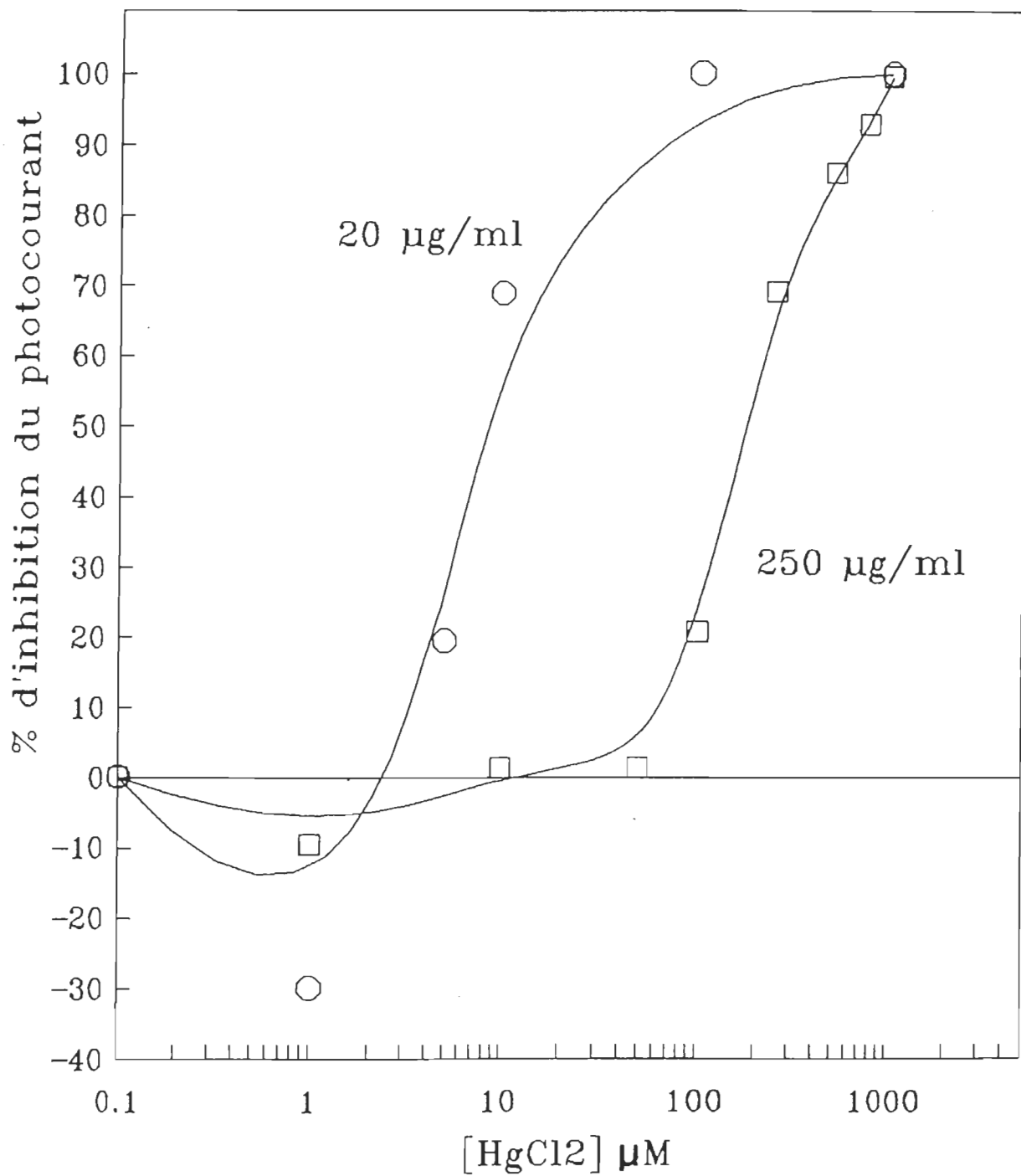


Figure 22. Détection du mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) par le bioessai à base de membranes photosynthétiques d'épinard à une concentration de Chl de 20 et 250  $\mu\text{g/ml}$ . Une augmentation significative du photocourant est observée à faibles concentrations de Hg, avant que ne débute l'effet inhibiteur. Cet effet est plus prononcé à 20  $\mu\text{g}$  Chl/ml.

discutent également d'observations similaires avec le mercure. Les derniers suggèrent qu'à faibles concentrations (0.004 ppm), les composés mercuriels agissent comme des régulateurs de croissance plutôt que comme inhibiteurs du PSII.

#### 3.3.2.2. Cuivre.

Le cuivre est un microélément essentiel des organismes végétaux (Droppa et Horvath, 1990). Le cuivre est largement distribué dans l'environnement puisqu'il est un constituant commun de la roche. Sa principale source d'émission dans l'environnement est l'exploitation minière (Goyer, 1980).

Plusieurs sites ont été proposés comme étant la cible de l'action du cuivre au niveau de la chaîne de transport d'électrons. Cependant, il est de plus en plus évident que le principal site d'inhibition du cuivre se situe au niveau du PSII. Un deuxième site d'inhibition a aussi été identifié au niveau du PSI, mais à des concentrations généralement supérieures à celles requises pour inhiber la majeure partie du PSII (Shioi et al., 1978; Wu et Lorenzen, 1984). D'ailleurs, Baszynski et al. (1988) ont démontré que chez des plants d'épinard cultivés dans un milieu contenant des niveaux toxiques de cuivre, la perte d'activité du PSII était plus rapide que celle du PSI.

Shioi et al. (1978) ont suggéré que cette inhibition du PSI pourrait être tributaire de l'interaction directe du cuivre avec la ferredoxine. Mentionnons également que pour Singh et al. (1989), le site d'action du  $\text{Cu}^{2+}$ , comme celui du  $\text{Hg}^{2+}$ , serait plutôt localisé près ou dans le complexe du cytochrome b-f, possiblement après le niveau de la cytochrome réductase chez la cyanobactérie *Cylindrospermum*.

Le principal site d'inhibition du  $\text{Cu}^{2+}$  au niveau du PSII se trouverait sur son côté oxydant, près de P680 (Shioi et al., 1978; Hsu et Lee, 1988; Rengenathan et Bose, 1989). Pour leur part, Mohanty et al. (1989) ont plutôt localisé le site primaire de l'action du Cu du côté réducteur du PSII, au niveau de la seconde quinone  $\text{Q}_b$ .

Cependant, d'autres auteurs ont suggéré que le complexe de dégagement d'oxygène était le site d'action du cuivre (Vierke et Struckmeier, 1978; Wu et Lorenzen, 1984). D'ailleurs, les résultats de Vierke et Struckmeier (1978) démontrent que le cuivre inhibe le dégagement d'oxygène en se liant à un résidu protéique qui est situé très près du complexe de dégagement d'oxygène.

D'autres modes d'action suggérés de la toxicité du cuivre sont: l'altération des propriétés de la Chl par le déplacement

du  $Mg^{2+}$  au centre des molécules de Chl (Wu et Lorenzen, 1984); l'inhibition de la conversion de l'énergie (photophosphorylation) due à l'oxydation des groupements sulfhydryls sur le facteur couplant I ( $CF_1$ ) de l'ATPase (Uribe et Stark, 1982); et une peroxydation des membranes thylacoïdiennes (Sandmann et Böger, 1980; Wu et Lorenzen, 1984).

Compte tenu de tous ces résultats, les mécanismes d'inhibition par le cuivre et les sites de son action sur la chaîne de transport d'électrons ne sont donc toujours que partiellement élucidés.

Une variation considérable existe entre les différentes valeurs de toxicité du cuivre chez les algues, mais la plupart, comme les thylacoïdes d'épinard, sont sensibles à quelques ppm (tableau XIV). Par contre, cette sensibilité du bioessai à base de membranes photosynthétiques d'épinard pour le Cu est exprimée dans un temps d'exposition relativement plus court.

Wu et Lorenzen (1984) ont utilisé un temps d'exposition de 60 min parce que ce n'est qu'après cette période que le maximum d'inhibition avec le cuivre chez *Chlorella fusca* ne fut atteint (tableau XIV). Ils expliquent ce phénomène par le fait qu'une grande partie du cuivre assimilé serait d'abord rejeté par le plasmalemma à la surface de la cellule, jusqu'à ce que ce

dernier soit suffisamment endommagé et ne puisse plus effectuer cette exclusion; le cuivre atteint alors l'appareil photosynthétique. L'exposition directe des membranes dans notre bioessai permet d'atteindre un niveau de sensibilité comparable à ces organismes entiers en seulement 5 min.

Des expériences ont démontré que la chélation du cuivre diminue sa toxicité sur les algues, et ce, en réduisant la concentration (ou l'activité) de l'ion cuivrique libre (Sunda et Guillard, 1976; Sunda et Lewis, 1978; Wurtsbaugh et Horne, 1982; Stratton, 1987). La toxicité du cuivre serait donc directement reliée à la concentration d'ions cuivriques libres et non à la concentration totale de cuivre. La présence de chélateurs réduit la toxicité du cuivre en le liant le dans un complexe non disponible biologiquement. Par conséquent, la sensibilité de notre bioessai pour le Cu ne serait pas à son niveau optimal parce que, comme mentionné à la section 3.2.3., le tampon Tes aurait légèrement tendance à former des complexes solubles avec les ions  $\text{Cu}^{2+}$ .

De plus, les résultats de Shioi et al. (1978), suite à des expériences avec des cellules brisées de l'algue verte *Ankistrodesmus falcatus*, suggèrent que l'inhibition par le cuivre serait étroitement en parallèle avec son assimilation, qui augmenterait avec l'augmentation du pH. Nos résultats, tel

que présentés à la figure 23, vont dans le même sens; plus le pH augmente, plus la sensibilité des thylacoïdes pour le Cu augmente jusqu'à une valeur limite où il diminue brusquement. Cette valeur limite correspond à un pH de 9 pour Shioi et al. à un pH de 10.5 pour notre expérience. Une hypothèse pour expliquer ce phénomène vient de Källqvist et Meadows (1978), qui ont également observé que la toxicité du cuivre dépendait du pH, i.e. que sa toxicité était plus élevée à des pH élevées; ils suggèrent une compétition entre les ions  $H^+$  et les  $Cu^{2+}$  pour l'occupation des sites actifs sur les membranes.

#### 3.3.2.3. Plomb.

Le plomb est un toxique à large spectre qui peut exercer des effets prononcés sur plusieurs systèmes cellulaires (Klaassen et al., 1986).

Les résultats de Becerill et al. (1988) démontrent que le Pb inhibe le transport d'électrons au niveau du PSII et n'a aucun effet sur le PSI *in vitro*. L'inhibition du PSII par le Pb semble être localisée sur son côté oxydant, puisque l'addition d'un donneur artificiel d'électrons restaure le transport d'électrons. Selon ces auteurs, quand la concentration de Pb est plus élevée que 0.2 mM, un autre site d'action du côté accepteur du PSII pourrait exister.

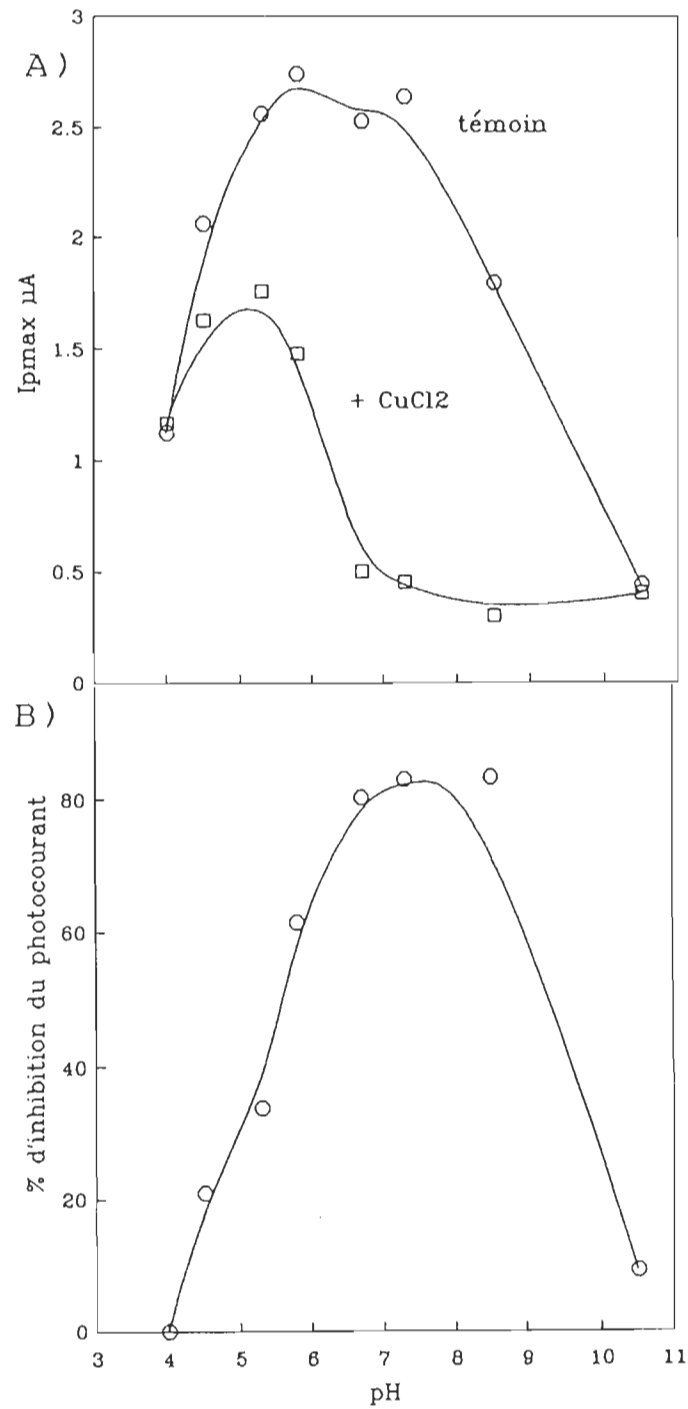


Figure 23. Détection du  $\text{CuCl}_2$  ( $10^{-5}\text{M}$ ) en fonction du pH à une concentration de Chl de  $125 \mu\text{g/ml}$ . A) courbe avec Cu et courbe témoin; B) % d'inhibition. La sensibilité des thylacoïdes pour le Cu augmente avec l'augmentation de l'alcalinité de la solution jusqu'à un pH de 8.5 et diminue brusquement à un pH de 10.5.

De plus, Irmer et al. (1986) soutiennent que l'exposition au plomb n'inhibe pas seulement les processus métaboliques, mais interfère également avec l'intégrité structurale des thylacoïdes. Pour leur part, Teige et al. (1990) suggèrent que, le rayon ionique du  $Pb^{2+}$  (119 pm) étant similaire à celui du  $Ca^{2+}$  (112 pm), cela lui permettrait une certaine mobilité à travers la membrane thylacoïdienne.

La sensibilité des thylacoïdes d'épinard au Pb est beaucoup plus faible que celle des deux algues de référence (Tableau XIV). Ce fait peut probablement s'expliquer par le manque de représentativité de ces algues et/ou des différences au niveau des conditions expérimentales, comme par exemple le temps d'exposition. Cependant, notre  $CI_{50}$  étant comparable à celle de Becerill et al. (1983) obtenue avec des chloroplastes de luzerne, soit d'environ 0.37 mM, peut-être que les thylacoïdes de plantes supérieures, à cause de différences structurales et organisationnelles, ont cette caractéristique d'être moins sensibles au Pb que ceux des algues.

#### 3.3.2.4. Cadmium.

Le cadmium est un élément relativement rare avec aucune fonction biologique connue. Il apparaît dans l'environnement principalement comme un composé des minéraux de la croûte



terrestre. L'utilisation industrielle du cadmium a accéléré la mobilisation biologique et le transport de cet élément, excédant les quantités impliqués dans son cycle naturel (Goyer, 1980).

Des études *in vitro* sur l'influence du cadmium ont démontré que l'inhibition du transport d'électrons photosynthétique se trouvait du côté donneur du PSII indiquant que le site de dégagement d'oxygène est très sensible au  $\text{Cd}^{2+}$  (Baszynski et al., 1980; Becerill et al., 1988). Li et Miles (1975) ont suggéré que le site ultime de l'inhibition par le  $\text{Cd}^{2+}$  était localisé dans le donneur primaire d'électrons ou dans le centre réactionnel du PSII. DeFillipis et al. (1981), ont suggéré que chez *Euglena*, en plus de légèrement affecter l'enzyme NADP oxydoréductase du côté du PSI, le cadmium, tout comme le zinc et le mercure, affecterait le complexe de dégagement d'oxygène, et que ce dernier constituerait le principal site pour l'ensemble de la chaîne de transport d'électrons. Cependant, pour plusieurs auteurs, le PSI semble être insensible au traitement au  $\text{Cd}^{2+}$  (Krupa et al., 1987; Becerill et al., 1988).

L'action toxique du cadmium sur *E. coli* est attribuée à la compétition du cadmium avec le magnésium dans les métabolismes cellulaires (Dorward et Barisas, 1984). En effet, en présence de fortes concentrations de magnésium, la toxicité du cadmium est manifestement diminuée. Peut-être ce mécanisme d'action du Cd

sur *E. coli* peut être associé à celui d'inhibition de la photosynthèse au niveau du PSII, soit une altération des propriétés de la chlorophylle par le déplacement du  $Mg^{2+}$  au centre de cette molécule. De plus, la présence de Mg dans notre tampon baignant les thylacoïdes peut avoir probablement diminué la toxicité du Cd.

Teige et al. (1990) suggèrent que les différents effets des métaux lourds seraient reliés à leurs propriétés chimiques, particulièrement leur rayon ionique, quand l'on compare ces derniers à ceux des métaux essentiels dans les thylacoïdes. Ainsi, l'inhibition du complexe de dégagement d'oxygène du PSII par le  $Cd^{2+}$  pourrait être expliquée par le déplacement du  $Mn^{2+}$  des thylacoïdes à cause de son rayon ionique similaire ( $Cd^{2+}$  95 pm,  $Mn^{2+}$  83 pm). Toutefois, le  $Cd^{2+}$  étant plus gros que le  $Zn^{2+}$  (73 pm), il ne pourrait déplacer aussi facilement le  $Mn^{2+}$  que le  $Zn^{2+}$ . De plus, la structure du complexe de dégagement d'oxygène jouerait un rôle important;  $Mn^{2+}$  étant lié à la protéine grâce à des liants assez forts comme l'oxygène, le  $Zn^{2+}$  serait préféré en comparaison à l'acide plus faible qu'est le  $Cd^{2+}$ . Ce mécanisme d'action pourrait expliquer la sensibilité moindre des thylacoïdes au Cd par rapport au Zn observée avec notre bioessai.

La sensibilité des thylacoïdes d'épinard au Cd est beaucoup

plus faible que celle de certaines algues, mais comparable à celle de certaines autres. Effectivement, tel que démontré par le tableau XIV, la sensibilité des algues et des cyanobactéries au Cd est très variable, de quelques ppb à plusieurs ppm. La sensibilité des thylacoïdes d'épinard est comparable à celles des algues les plus résistantes. Cependant, le temps d'exposition est un facteur ayant probablement joué en défaveur de notre bioessai. En effet, tel que démontré par le tableau VI, la sensibilité des cellules au cadmium augmente directement avec le temps d'exposition. Selon Stratton et Corke (1979a), cela prendrait 2 h pour obtenir une inhibition maximale avec des cellules entières d'algues.

De plus, comme la plupart des métaux lourds, la toxicité du cadmium est fonction de la concentration d'ions métalliques libres, et non de la concentration totale du métal. Par exemple, Hofslagare et al. (1985) ont démontré que la consommation de carbone photosynthétique est moins affectée par le cadmium dans une solution contenant du  $\text{Cl}^-$  que dans une solution sans  $\text{Cl}^-$ . Les auteurs croient que ce résultat est provoqué par un complexe se formant entre le  $\text{Cd}^{2+}$  et le  $\text{Cl}^-$ . Cette diminution de l'inhibition de la photosynthèse indique que le  $\text{Cd}^{2+}$  complexé avec le  $\text{Cl}^-$  n'est pas aussi disponible que l'ion métallique libre. Ce phénomène est confirmé par la tendance bien établie que les algues marines sont généralement moins sensibles que les algues d'eaux douces.

En effet, probablement moins de  $\text{Cd}^{2+}$  est disponible dans l'eau de mer à cause de sa complexation entre autres avec les chlorures (Stratton, 1987). De plus, des études antérieures ont établi que, chez le bioessai *Microtox*<sup>MD</sup>, une augmentation de la force ionique des solutions testées diminue significativement la toxicité de métaux tels que le zinc et le cadmium, mais non le cuivre (Ankley et al., 1989). Notre tampon contenant 12 mM de chlorures, ce facteur a également probablement joué en défaveur de la sensibilité de notre bioessai pour le Zn et Cd.

#### 3.3.2.5. Zinc.

Le zinc est un microélément essentiel aux plantes supérieures et est impliqué dans plusieurs processus métaboliques importants, dont dans le système de transport d'électrons (Påhlsson, 1989).

Le zinc inhibe le flux d'électrons du côté oxydant du PSII. Le PSI serait inactivé à des concentrations supérieures à celles nécessaires à l'inhibition du PSII (Tripathy et Mohanty, 1980). De plus, comme pour le cadmium et le mercure, De Fillipis et al. (1981), ont suggéré que chez *Euglena*, en plus de légèrement affecter l'enzyme NADP oxydoréductase, le zinc affecterait le complexe de dégagement d'oxygène, et que ce dernier constituerait le principal site pour l'ensemble de la chaîne de

transport d'électrons. Teige et al. (1990) vont dans le même sens en suggérant que le  $Zn^{2+}$  inhiberait le complexe de dégagement d'oxygène du PSII en déplaçant le  $Mn^{2+}$  des thylacoïdes à cause de son rayon ionique similaire, et ce, plus efficacement que le  $Cd^{2+}$  (voir section sur le Cd).

Comme pour le Cd, la sensibilité des thylacoïdes d'épinard au Zn est beaucoup plus faible que celle de certaines algues, mais comparable à celle des plus résistantes. Effectivement, tel que démontré par le tableau XIV, la sensibilité des algues et des cyanobactéries au Zn est également très variable, de quelques ppb à plusieurs ppm. De la même façon que pour le Cd, le temps d'exposition (tableau VI) et la forte concentration en chlorures de notre tampon sont des facteurs ayant probablement joué en défaveur de notre bioessai. Les résultats de Green et al. (1975) vont dans le même sens; la sensibilité de *Selenastrum capricornutum* au zinc est inversement proportionnelle à la force ionique du milieu.

#### 3.3.2.6. Retour sur l'ensemble des métaux lourds.

Comme pour les herbicides, à une exception, celle du plomb, toutes les valeurs de  $CI_{50}$  de métaux lourds du bioessai à base de membranes photosynthétiques d'épinard sont comparables à celles obtenues avec d'autres bioessais basés sur la

photosynthèse mais effectuer sur des organismes entiers, soient différentes algues et cyanobactéries, et ce, avec un temps d'exposition généralement plus court (Tableau XIV). L'ordre de sensibilité est également comparable, soit  $Hg > Cu > Pb > Zn > Cd$  pour notre bioessai, et  $Hg > Cu > Pb > Cd > Zn$  pour l'ensemble des bioessais de comparaison. En effet, en général chez les algues, le mercure est le plus toxique (Stratton, 1987), et le zinc le moins toxique des métaux lourds (Påhlsson, 1989).

Pour ce qui est de la comparaison des  $CI_{50}$  des métaux lourds étudiés avec des bioessais reconnus (Tableau XV), les  $CI_{50}$  du bioessai à base de thylacoïdes d'épinard sont de même ordre de grandeur que celles du Microtox<sup>MD</sup>, à l'exception du Hg, où le Microtox<sup>MD</sup> se démontre beaucoup plus sensible. D'autre part, les  $CI_{50}$  du bioessai à base de membranes photosynthétiques d'épinard pour le Pb, le Zn et surtout le Cd sont de beaucoup supérieures à celles établies pour la truite arc-en-ciel. Par contre, celles pour le Hg et le Cu sont comparables à celles de ce poisson.

### 3.3.3. Autres substances.

Très peu d'informations sont disponibles sur les autres substances testées. Quoique incomplètes, elles sont présentées au tableau XVI.

Tableau XV. Comparaison de la réponse à différents métaux lourds du bioessai à base de membranes photosynthétiques d'épinard (20 µg Chl/ml) avec celle d'autres bioessais reconnus, soit le Microtox<sup>MD</sup> et la truite arc-en-ciel.

métal lourd	ppm (µM)		
	épinard cellule 5 min CI <sub>50</sub>	Microtox 5 min CI <sub>50</sub>	poisson 96 h CL <sub>50</sub>
Hg	1.6 (8)	0.08 (0.3) <sup>b</sup>	0.21 (1) <sup>b</sup>
Cu	3.5 (55)	8.0 (130) <sup>b</sup>	0.1-10.7 (1.5-170) <sup>b</sup>
Pb	70.5 (340)	30 (150) <sup>a</sup>	3.5 (17) <sup>d</sup>
Cd	309 (2750)	154 (1400) <sup>c</sup>	0.01 (0.1) <sup>d</sup>
Zn	92 (1400)	49 (750) <sup>b</sup>	2.2 (30) <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Bitton, 1983. N.B. Microtox 15 min CI<sub>50</sub>

<sup>b</sup> Ribo et Kaiser, 1987.

<sup>c</sup> Miller et al., 1985.

<sup>d</sup> Knobeloch et al., 1990.

Tableau XVI. Comparaison de la réponse à différents toxiques du bioessai à base de membranes photosynthétiques d'épinard avec celle d'autres bioessais basés sur la croissance de différentes espèces d'algues et avec celle de bioessais reconnus soit le Microtox<sup>MD</sup> et la truite arc-en-ciel.

toxique	ppm (mM)			
	épinard cellule 20 µg Chl/ml 5 min CI <sub>50</sub>	13 espèces d'algues CI <sub>100</sub> <sup>a</sup>	Microtox 5 min CI <sub>50</sub> <sup>b</sup>	poisson 96 h CL <sub>50</sub> <sup>b</sup>
NaNO <sub>2</sub>	7650 (90)	580-9200 (7-108)	-----	-----
SDS	15 (0.05)	31-4000 (0.1-13.8)	1.6 (0.0055)	5-46 (0.017-1.16)
phénol	941 (10)	-----	25 (0.26)	9-66 (0.1-0.7)
éthanol	75000 (1630)	-----	31000 (674)	13500 (293)

<sup>a</sup> Blank et al., 1984.

<sup>b</sup> Ribo et Kaiser, 1987.



Les valeurs de  $CI_{50}$  du bioessai à base de membranes photosynthétiques d'épinard pour le nitrite et le SDS, seules substances dont des valeurs de référence ont pu être dénichées, sont comparables à celles obtenues avec un autre bioessai basé sur la croissance de 13 espèces d'algues entières, et ce, avec un temps d'exposition beaucoup plus court (5 min vs 14 j). A remarquer que les valeurs indiquées pour ce bioessai sont des  $CI_{100}$ , soit les concentrations les plus faibles provoquant aucune croissance détectable.

Pour ce qui est de la comparaison des  $CI_{50}$  avec des bioessais reconnus, les  $CI_{50}$  du bioessai à base de membranes photosynthétiques d'épinard sont plus élevées que celles du Microtox<sup>MD</sup>, à l'exception de l'éthanol, où les  $CI_{50}$  sont de même ordre de grandeur. D'autre part, les  $CI_{50}$  du bioessai à base de membranes photosynthétiques d'épinard pour le SDS et l'éthanol sont comparables à celles établies pour la truite arc-en-ciel. Par contre, ce poisson se montre beaucoup plus sensible pour le phénol.

### 3.4 Essais préliminaires avec des échantillons réels.

Suite à cette caractérisation de la réponse des thylacoïdes à divers toxiques, nous avons effectué des essais préliminaires avec des échantillons réels provenant de deux effluents

distincts d'une même usine dont l'analyse chimique avait été effectuée; cette dernière est présentée au tableau XVII. Les résultats des bioessais avec les thylacoïdes d'épinard sont présentés à la figure 24. L'effluent industriel #1 inhibe à partir d'une concentration supérieure à 1% (v/v), alors que l'échantillon #2 provoque d'abord une stimulation du photocourant qui atteint son maximum à une concentration de 20% (v/v). Cette stimulation ne disparaît qu'à une concentration de 50% (v/v); par la suite, plus la concentration de cet échantillon est élevée, plus le photocourant est inhibé.

Cette stimulation peut masquer des effets toxiques. L'observation d'une stimulation du paramètre mesuré n'est pas une exclusivité du bioessai testé ici. D'autres bioessais démontrent également parfois le même effet (Ross et al., 1988).

Ce phénomène peut probablement s'expliquer par le fait que, malgré la réalité bien établie que plusieurs métaux lourds, herbicides et insecticides inhibent le taux de dégagement d'oxygène chez les algues, il existe également quelques rapports concernant la nature stimulative de quelques toxiques, du moins à de faibles concentrations. Comme mentionné à la section 3.3.2, DeFilippis et Pallaghy (1976) rapportent une augmentation dans le taux de dégagement d'oxygène aux faibles concentrations de mercure. Sahu et al. (1988), Shaw et al. (1988), et Shieh et

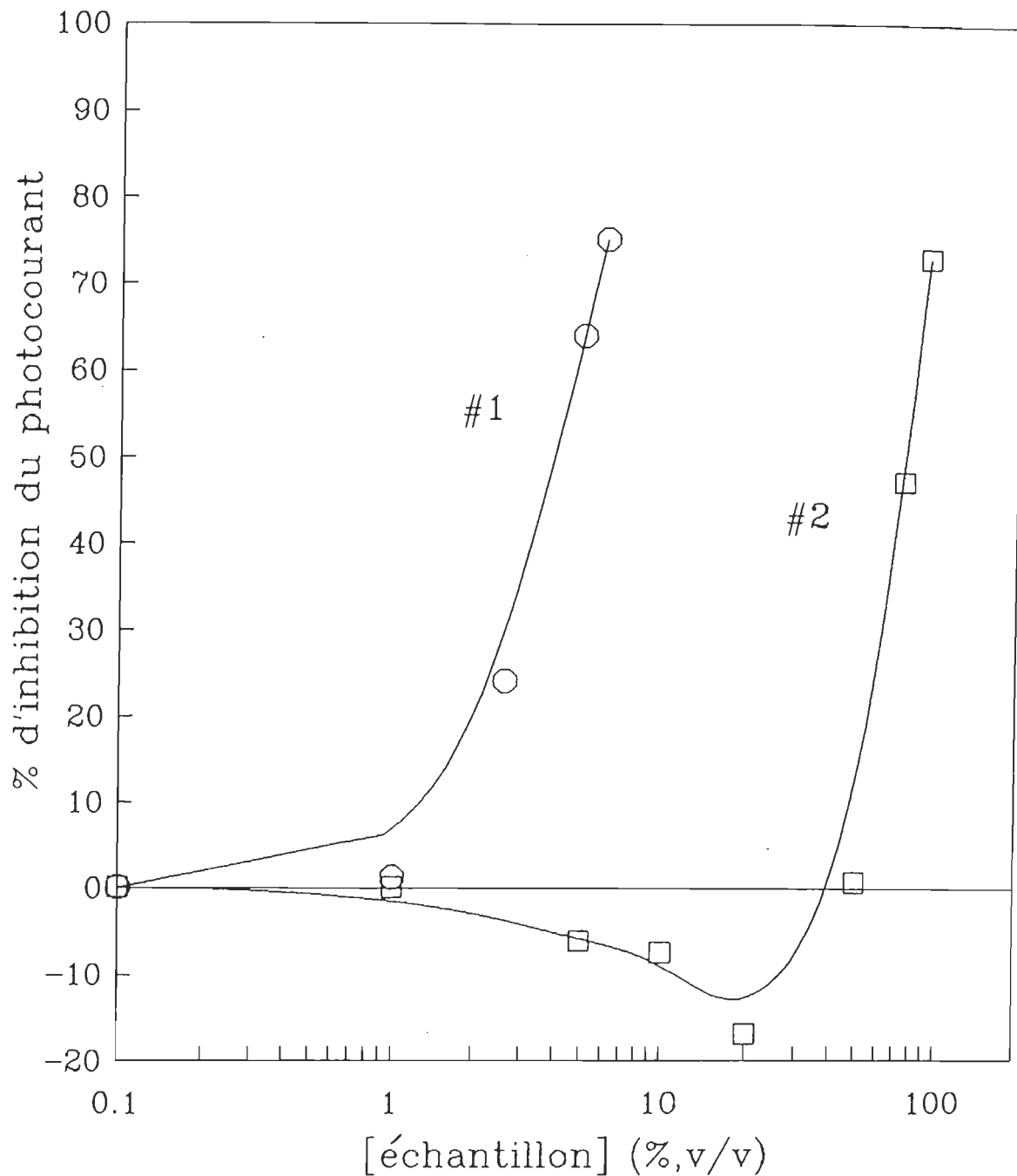
Tableau XVII. Analyse chimique des deux échantillons d'effluents distincts (#1 et #2) d'une même usine utilisés pour l'essai du bioessai. Les  $CI_{50}$  pour notre bioessai à base de thylacoïdes ont été indiquées à titre comparatif.

substances analysées	concentration (ppm)		
	#1	#2	$CI_{50}$ thylacoïdes
Zn	0.083	4.155	92
Cu	0.047	0.084	3.5
Cr	0.050	0.064	-----
Pb	0.050	0.109	70
Cd	0.019	0.026	309
Al	123	80	-----
Na	2063	1370	-----
Hg	0.00055	0.00061	4.2
Ca	24	161	-----
As	0.110	0.022	-----
SO <sub>4</sub>	3218	2508	-----
F	105	80	-----
SD	6329	5062	-----
SS	136	652	-----
ST	7133	5746	-----
pH	10.86	8.65	-----

SD = solides dissous

SS = solides en suspension

ST = solides totaux



**Figure 24.** Détection de la toxicité de deux échantillons (#1 et #2) d'effluents distincts d'une même usine utilisés pour l'essai du bioessai. L'effluent industriel #1 inhibe à partir d'une concentration supérieure à 1% (v/v), alors que l'échantillon #2 provoque d'abord une stimulation du photocourant jusqu'à une concentration de 50% (v/v), pour inhiber par la suite. L'expérience a été effectuée à une concentration de Chl de 20  $\mu\text{g/ml}$ .

Barber (1973) discutent également d'observations similaires avec ce métal. Pour leur part, Sikka et Butler (1977), lors de leur étude sur les effets des composées organochlorés sur les algues marines, ont observé que le trichlorophénol, à faibles concentrations, stimulait la croissance de plusieurs de ces algues, alors qu'il devenait inhibiteur à plus fortes concentrations. Mentionnons également que les différents niveaux de toxicité des substances d'un mélange peuvent s'avérer additifs, synergiques ou antagonistes.

Le facteur "stimulateur" est donc soit l'une des substances analysées dans l'analyse chimique, soit une combinaison de certaines de ces substances, soit une substance non mesurée par cette analyse chimique, qui est loin d'être exhaustive.

A remarquer que pour les 5 substances analysées dont nous avons une valeur de référence pour notre bioessai, leurs concentrations dans les échantillons industriels seraient en principe beaucoup trop faibles pour être détectées individuellement par ce dernier. Remarquer également la forte concentration de solides dissous et en suspension. Cette observation est importante puisque des toxiques organiques hydrophobes et métalliques se lient à des particules organiques et à de la matière organique dissoute, affectant d'autant la biodisponibilité de ces toxiques (McCarthy et Bartell, 1988).

Par exemple, les systèmes eutrophiques qui contiennent de fortes concentrations d'absorbants organiques démontrent des concentrations plus faibles de toxiques librement dissous, rapidement disponibles, diminuant d'autant l'exposition des organismes vivants (McCarthy et Bartell, 1988). Toutefois, l'analyse chimique indique une plus grande quantité de solides dans l'échantillon #1, qui démontre une plus grande toxicité, que dans le #2.

D'où l'avantage du bioessai, qui constitue un intégrateur des effets d'un mélange de toxiques, fournissant ainsi rapidement un indice de toxicité, sans que l'on ait besoin de passer par une longue et dispendieuse analyse chimique. Selon nos résultats, ces effluents constituent un potentiel toxique pour les producteurs primaires du milieu aquatique récepteur, du moins jusqu'à ce que leur concentration soit inférieure à 1% (v/v) pour l'effluent #1, et 50% (v/v) pour l'effluent #2.

## CHAPITRE IV

### CONCLUSION

L'origine photosynthétique du photocourant dans la cellule électrochimique est de nouveau confirmée par sa forte corrélation avec le dégagement d'oxygène. Un argument de plus est la forme d'apparence sigmoïde des courbes dose-réponse obtenues en présence de nombreux toxiques étudiés. En effet, cette forme est caractéristique de la relation entre le degré de réponse d'un système biologique et la concentration d'un toxique dans un milieu (Klaassen et al., 1986).

L'épinard, l'orge et le plant de tomate se sont avérés des espèces végétales adéquates pour l'utilisation de leurs thylacoïdes dans le biocapteur. Des thylacoïdes d'espèces variées peuvent donc être probablement utilisés comme bioessai.

Afin d'optimiser la réponse du matériel biologique, le choix de l'orge est abandonné, au bénéfice de l'épinard, parce que pour une même concentration de Chl, le rendement d'activité électrochimique de l'épinard est supérieur à celui de l'orge. De plus, l'efficacité du MV et du  $\text{NaN}_3$  à augmenter le photocourant déclinant avec la diminution de la concentration de Chl, leur utilisation a été délaissée, puisqu'inutile là où la sensibilité du biocapteur devrait être amplifiée.

Le potentiel imposé est diminué de 750 à 500 mV. Cette modification favorise les mesures à faibles concentrations de Chl (là où une augmentation de la sensibilité est escomptée), une diminution du temps d'équilibration, et une diminution des artéfacts électriques divers, tout en ne modifiant en rien la  $CI_{50}$  d'un inhibiteur.

La sensibilité de la cellule peut être effectivement améliorée entre autres par une diminution de la concentration de Chl. En effet, les  $CI_{50}$  déterminées sont directement proportionnelles à la concentration de Chl. Cependant, cette augmentation de la sensibilité est variable d'une substance inhibitrice à l'autre, et son importance est généralement moins considérable que prévue. Ce dernier fait est probablement tributaire d'une concentration ionique du tampon trop élevée à faible concentration de Chl; l'empilement des thylacoïdes est alors favorisé, entraînant une diminution de l'accès au PSII, principal site d'inhibition pour la majorité des toxiques étudiés. La composition ionique du tampon à faibles concentrations de Chl devrait donc être modifiée de façon à favoriser un désemplément des thylacoïdes.

L'inhibition par le Cu et le Hg s'est avérée dépendante de la nature du tampon utilisé. La sensibilité des thylacoïdes à ces métaux est plus élevée dans le tampon Tes que dans le tampon



phosphate. Le tampon Tes s'avérant adéquat pour l'ensemble des produits testés, il fut utilisé tout au long de l'expérimentation.

Une amélioration intéressante de la sensibilité à certains toxiques peut être obtenue en augmentant le temps d'exposition de 5 à 30 minutes, limite du temps de vie des thylacoïdes à l'obscurité et à température de la pièce. L'application des thylacoïdes dans un biocapteur est donc présentement limitée à une mesure de toxicité aiguë. L'immobilisation dans une matrice appropriée constitue une solution possible à ce problème (Lemieux et Carpentier, 1988; Carpentier et al., 1989; Purcell et al., 1990; Carpentier et al. 1991).

La température est un autre facteur pouvant affecter la sensibilité des membranes thylacoïdiennes aux toxiques. En effet, la sensibilité au cuivre s'est accrue avec une augmentation de la température, tandis que celle pour l'atrazine s'est accrue avec un abaissement de la température.

L'expérimentation a démontré que plusieurs autres facteurs physico-chimiques ayant un contrôle sur l'action toxique d'un polluant doivent toujours être considérés dans une telle étude. Ces facteurs sont: la formulation chimique du toxique étudié, le pH du tampon, la nature et la concentration des ions ajoutés, la

présence de matière organique et la quantité et le temps d'exposition à la lumière.

Le bioessai *in vitro* à base de thylacoïdes d'épinard s'est avéré sensible à la plupart des toxiques étudiés, et son niveau de sensibilité à ces toxiques s'est démontré comparable à celui de bioessais effectués avec des organismes entiers, soient différentes espèces d'algues et de cyanobactéries, et ce malgré un temps d'exposition généralement plus court (5 min). Ce niveau de sensibilité a été atteint par une diminution de la concentration de Chl à 20 µg/ml. L'ordre d'importance dans lequel les thylacoïdes sont sensibles aux différents toxiques est également comparable à celui des organismes entiers. Le bioessai *in vitro* à base de membranes photosynthétiques serait donc adéquat comme test de "prébalayage" compte tenu de sa forte corrélation avec les indices de toxicité de divers toxiques fournis par les tests sur les organismes entiers visés.

Nos résultats confirment ainsi la similitude de la fonction photosynthétique entre organismes végétaux de différents niveaux d'organisation. La toxicité limitée des différents toxiques testés aux plantes supérieures intactes et leur toxicité relativement élevée sur le transport d'électrons photosynthétiques chez des thylacoïdes isolés, nous suggère que lorsque ces toxiques sont présents dans le sol, ces derniers ne

sont pas absorbés par le feuillage ou le système racinaire et transloqués aux chloroplastes en concentrations suffisantes pour exprimer une toxicité précoce. Compte tenu de l'exposition directe des cellules phytoplanctoniques dans le milieu aquatique, cette toxicité relativement élevée que démontrent ces toxiques sur des thylacoïdes isolés de plantes supérieures est ainsi comparable à celle démontrée sur le phytoplancton. La réponse des thylacoïdes isolés de plantes supérieures telle que l'épinard peut être considérée globalement représentative de celle du phytoplancton.

En effet, comm Hollister et Walsh (1973) et nous-mêmes avons pu le constater, il existe une grande diversité de réponses entre espèces chez les algues, même à l'intérieur d'une même famille taxonomique. Donc, de toute façon, pour avoir des données réalistes de l'impact d'une substance ou d'un effluent quelconque, il faudrait effectuer des bioessais sur plusieurs espèces d'algues de plusieurs familles différentes, présentes dans l'écosystème aquatique récepteur étudié. Par contre, compte tenu que des thylacoïdes d'espèces variées peuvent être utilisés dans la cellule électrochimique, la recherche d'un végétal plus représentatif des espèces les plus sensibles serait à envisager. Par exemple, la sensibilité de l'algue verte *Selenastrum capricornutum* pourrait être investiguée. Cette algue est employée communément en Amérique du Nord pour diverses

applications environnementales et est une des algues vertes recommandées comme espèces à tester pour l'évaluation de la toxicité aquatique (Swanson et Peterson, 1992).

La représentativité de notre bioessai peut être également discutée au niveau du paramètre physiologique choisi, soit le transport d'électrons photosynthétique. En effet, d'autres réactions comme celles reliées à la division cellulaire, peuvent être affectées à des concentrations plus faibles que celles utilisées dans notre étude et celles mentionnées; les résultats obtenus dans ces conditions ont un rapport physiologique variable. Cependant, un paramètre plus sensible pour un toxique ne le sera pas nécessairement pour un autre. Par exemple, selon Stratton (1987), pour les herbicides et le Cu, la photosynthèse est plus sensible que la croissance ou la respiration, mais, pour la détection du Hg, la croissance semble être un critère de toxicité plus sensible que la photosynthèse ou tout autre processus cellulaire.

De plus, selon Shaw et al. (1988), le taux de croissance peut être mesuré indirectement par le taux de photosynthèse. Dans le même sens, Eley et al. (1983) suggèrent que l'inhibition de la photosynthèse est elle-même responsable de l'inhibition de la croissance, mais que réciproquement le taux de photosynthèse est dépendant de la concentration de pigments photosynthétiques.

Walsh (1972) a démontré que, chez 4 espèces d'algues marines, les  $CI_{50}$  pour des inhibiteurs de la réaction de Hill, tels que l'atrazine et le diuron, sont approximativement les mêmes pour les taux de croissance et de photosynthèse. Nous considérons que la photosynthèse est un paramètre physiologique très représentatif de la viabilité de l'ensemble de l'organisme.

Pour ce qui est de la comparaison avec des bioessais reconnus que sont le Microtox<sup>MD</sup> et la truite arc-en-ciel, les résultats sont variables. Notre bioessai est plus sensible aux herbicides, au DDT et à la dieldrin que le Microtox<sup>MD</sup>, démontre une sensibilité comparable à la majorité des métaux lourds et à l'éthanol, mais le Microtox<sup>MD</sup> est plus sensible au Hg, PCP, SDS et phénol. Notre bioessai est plus sensibles aux herbicides que la truite arc-en-ciel, démontre une sensibilité comparable pour le Hg, le Cu, le SDS et l'éthanol, et est moins sensible que ce poisson pour ce qui est des insecticides, du Pb, du Zn, du Cd et du phénol.

Cette diversité était prévisible compte tenu que ces différents organismes vivants que sont une plante, une bactérie et un poisson, appartiennent à des règnes et des ordres phylogéniques différents. D'où la recommandation d'utiliser une combinaison de bioessais impliquant des organismes de différents niveaux biologiques, afin de mieux appréhender les dangers

potentiels associés à un mélange de toxiques pour l'ensemble des êtres vivants d'un écosystème. Néanmoins, soulignons de nouveau que le phytoplancton est à la base de la chaîne alimentaire.

Suite à cette caractérisation de la réponse des thylacoïdes à divers toxiques, des essais préliminaires du biocapteur avec des échantillons récoltés sur le terrain ont été effectués. Les deux échantillons, à des degrés différents, ont démontré la présence d'un potentiel toxique pour les producteurs primaires du milieu aquatique récepteur. Cependant, avant l'effet inhibiteur, l'un des échantillons a démontré une stimulation du photocourant. Ce phénomène peut probablement s'expliquer par la nature stimulative de certains toxiques à faibles concentrations. L'observation d'une stimulation du paramètre mesuré n'est pas une exclusivité de notre bioessai. D'autres bioessais démontrent parfois le même effet.

Pour terminer, si le bioessai à base de membranes photosynthétiques était évalué en fonction de cinq critères opérationnels généralement utilisés dans le secteur des bioessais, les résultats correspondraient à peu près à l'évaluation notée au tableau XVIII. Ainsi, selon nos résultats, le bioessai à base de membranes photosynthétiques s'avère un test d'évaluation de la toxicité pour les producteurs primaires simple, rapide, sensible, représentatif et peu coûteux.

TABLEAU XVIII. Evaluation du bioessai à base de membranes photosynthétiques en fonction de cinq critères opérationnels généralement utilisés:

paramètre	Evaluation			
	excellente	bonne	moyenne	faible
- simplicité	X			
- rapidité	X			
- sensibilité		X		
- représentativité		X		
- coûts	X			

## BIBLIOGRAPHIE

- Ajlani, G., Meyer, I., Astier, C. et C. Vernotte. 1989. Inhibition of photosystem II by ioxynil in wild type and resistant mutant of *Synechocystis* 6714. *Z. Naturforsch.* **44c**: 979-984.
- Akbar, S. et L.J. Rogers. 1985. Effects of DDT on photosynthetic electron flow in *Secale* species. *Phytochemistry* **24**: 2785-2789.
- Allen, M.J. et A.E. Crane. 1976. Null potential voltammetry- an approach to the study of plant photosystems. *Bioelectrochem. and Bioenerg.* **3**: 84-91.
- Allen, M.M., Turnburke, A.C., Lagace, E.A. et K.E. Steinback. 1982. Effects of photosystem II herbicides on the photosynthetic membranes of the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6308. *Plant. Physiol.* **71**: 388-392.
- Amesz, J. 1987. Photosynthesis: New comprehensive biochemistry, volume 15. Elsevier. Amsterdam. 355 p.
- Ankley, G.T., Hoke, R.A. Giesy, J.P. et P.V. Winger. 1989. Evaluation of the toxicity of marine sediments and dredge spoils with the Microtox<sup>R</sup> bioassay. *Chemosphere* **18**: 2069-2075.
- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**: 1-15.
- Barber, J., Mills, J. et A. Love. 1977. Electrical diffuse layers and their influence on photosynthetic processes. *FEBS Letters* **74**: 174-181.
- Baszynski, T., Tukendorf, A., Ruszkowska, E., Skorzynska, E. et W. Maksymiec. 1988. Characteristics of the photosynthetic apparatus of copper non-tolerant spinach exposed to excess copper. *J. Plant Physiol.* **132**: 708-713.
- Baszynski, T., Wajda, L., Krol, M., Wolinska, D. Krupa, Z. et A. Tukendorf. 1980. Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. *Physiol. Plant.* **48**: 363-370.
- Becerril, J.M., Munoz-Rueda, A., Aparicio-Tejo, P. et C. Gonzalez-Murua. 1988. The effects of cadmium and lead on photosynthetic electron transport in clover and lucerne. *Plant Physiol. Biochem.* **26**: 357-363.
- Bitton, G. 1983. Bacterial and biochemical tests for assessing chemical toxicity in the aquatic environment: a review. *CRC critical reviews in environmental control.* **13**: 51-67.



Blaise, C., Bermingham, N. et R. Van Coillie. 1985. La méthode d'évaluation écotoxicologique intégrée: une contribution à la lutte contre l'écotoxicité. Bull. Qualité eaux, 10:4-11, 58-59.

Blank, H., Wallin, G. et S. Wängberg. 1984. Species-dependent variation in algal sensitivity to chemical compounds. Ecotox. and Environ. Safety 8: 339-351.

Blondin, G.A., Knobeloch, L.M., Read, H.W. et J.M. Harkin. 1989. An *in vitro* submitochondrial bioassay for predicting acute toxicity in fish. Aquatic toxicology and environmental fate: eleventh volume, ASTM, STP 1007, G.W. Suter II and M.A. Lewis éd. American Society for testing and materials, Philadelphia, pp. 551-563.

Bridgham, S.D., McNaught, D.C. et C. Meadows. 1988. Effects of complex effluents on photosynthesis in lake Erie and lake Huron. Functional Testing of aquatic Biota for estimating hazards of chemicals, ASTM STP 988. J. Cairns Jr. et J.R. Pratt éd. American Society for Testing and Materials. Philadelphie. pp.74-85.

Carpentier, R., Leblanc, R.M. et M. Mimeault. 1987. Photoinhibition and chlorophyll photobleaching in immobilized thylakoid membranes. Enzyme Microb. Technol. 9: 489-493.

Carpentier, R., Lemieux, S., Mimeault, M., Purcell, M. et D.C. Goetze. 1989. A photoelectrochemical cell using immobilized photosynthetic membranes. Bioelectrochem. and Bioenerg. 22: 391-401.

Carpentier, R., C. Loranger, J. Chartrand et M. Purcell. 1991. Photoelectrochemical cell containing chloroplast membranes as a biosensor for phytotoxicity measurements. Anal. Chim. Acta 249: 55-60.

Carpentier, R. et M. Mimeault. 1987. The photosynthetic partial reactions involved in photoelectrochemical current generation by thylakoid membranes. Biotechnol. Lett. 9: 111-116.

Chapman, D.J. et J. Barber. 1989. Recent work on photosystem two: structure and site of action of inhibitors of photosynthetic electron transport. Brighton crop protection conference. Weeds 9B-2: 1185-1196.

Chapman, D.J., De-Felice, J. et J. Barber. 1985. Characteristics of chloroplast thylakoid lipid composition associated with resistance to triazines herbicides. Planta 166: 280-285.

- Cossarini-Dunier, M., Demael, A., Rivière, J.L. et D. Lepot. 1988. Effects of oral doses of the herbicide atrazine on carp (*Cyprinus carpio*). *Ambio* 17: 401-405.
- Cotton, F.A. et G. Wilkinson. 1988. Advanced inorganic chemistry, 5è éd. John Wiley & sons. New York.
- De Filippis, L.F., R. Hampp et H. Ziegler. 1981. The effects of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on *Euglena*. II. Respiration, photosynthesis and photochemical activities. *Arch. Microbiol.* 128: 407-411.
- De Filippis, L.F. et C.K. Pallaghy. 1976. The effect of sublethal concentrations of mercury and zinc on *Chlorella*. II. Photosynthesis and pigment composition. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd 78: 314--322.
- Dorward, E.J. et B.G. Barisas. 1984. Acute toxicity screening of water pollutants using a bacterial electrode. *Environ. Sci. Technol.* 18: 967-972.
- Droppa, M. et G. Horvath. 1990. The role of copper in photosynthesis. Critical review in plant sciences 9: 111-123.
- Ducruet, J.-M., Creuset, S. et J. Viénot. 1990. Kinetics of action of different photosystem II herbicides on thylakoids. *Z. Naturforsch.* 45c: 348-352.
- Eley, J.H. McConnell, J.F. et R.H. Catlett. 1983. Inhibition of metribuzin on growth and photosynthesis of the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Environ. Expl. Bot.* 23: 365-368.
- Environnement Canada. 1990. Les toxiques dans le St-Laurent: une menace invisible, mais réelle. Feuillet d'information sur l'état du St-Laurent publié par le Centre St-Laurent. 8 p.
- Eversman, S. et L.L. Sigal. 1987. Effects of SO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, and SO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> in combination on photosynthesis and ultrastructure of two lichens species. *Can. J. Bot.* 65: 1806-1818.
- Finney, D.J. 1971. Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge.
- Foyer, C.H. 1984. Photosynthesis. E.E. Bittar éd. 219 p.
- Freedman, B. 1989. Environmental ecology: the impact of pollution and other stresses on ecosystem structure and function. Academic Press. San Diego. 424 p.
- Frew, E.J. et A.O. Hill. 1987. Electrochemical biosensors. *Anal. Chem.* 59: 933A-944A.

Goetze, D. et R. Carpentier. 1990. Monitoring oxygen reduction by photosystem I in whole thylacoid membranes using a photoelectrochemical cell. J. of Photochem. and photobiol. B: Biol. 8: 17-26.

Good, N.E. et S. Isawa. 1972. Hydrogen Ion Buffers. p.53-68. Dans: Methods in enzymology. vol.24: Photosynthesis and nitrogen fixation. A. SanPietro éd. Academic Press. New York.

Goyer, N. 1980. Vue d'ensemble sur les substances toxiques: métaux lourds. Environnement Québec (Bureau d'étude sur les substances toxiques). Québec. BEST-23. 74p.

Greenbaum, E. 1989. Biomolecular electronics: observation of oriented photocurrents by entrapped platinized chloroplast. Bioelectrochem. Bioenerg. 21: 171-177.

Greene, J.C., Miller, W., Shiroyama, T. et E. Merwin. 1975. Toxicity of zinc to the green alga *Selenastrum capricornutum* as a function of phosphorous or ionic strength. in: Biostimulation and nutrient assessment workshop. EPA-660/3-75-034.

Gregory, R.P.F. 1989. Biochemistry of photosynthesis. 3è éd. John Wiley & sons. London. 257 p.

Guilbault, G.G. et G.L. Lubrano. 1973. An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose. Anal. Chim. Acta 64 :439-455.

Hader, D.-P. et M. Tevini. 1987. General Photobiology. Pergamon Press. Oxford.

Hickey, C.W., C. Blaise et G. Costan. 1991. Microtesting appraisal of ATP and cell recovery toxicity end points after acute exposure of *Selenastrum capricornutum* to selected chemicals. Environ. Toxicol. and water quality: an international journal 6: 383-403.

Hofslagare, O. Samuelsson, G. et S. Sjöberg. 1985. Cadmium effects on photosynthesis and nitrate assimilation in *Scenedesmus obliquus*. A potentiometric study in an open CO<sub>2</sub>-system. Environ. Exper. Bot. 25: 75-82.

Hollister, T.A. et G.E. Walsh. 1973. Differential responses of marine phytoplankton to herbicides: oxygen evolution. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 9: 291-295.

Hsu, B.D. et J.-Y. Lee. 1988. Toxic effects of copper on photosystem II of spinach chloroplasts. Plant Physiol. 87: 116-19.

Hutber, G.N., L.J. Rogers et A.J. Smith. 1979. Influence of pesticides on the growth of cyanobacteria. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* 19: 397-402.

Irmer, U., Wachholz, I., Schafer, H. et D.W. Lorch. 1986. Influence of lead on *Chlamydomonas reinhardtii* Danegard (Volvocales, Chlorophyta): accumulation, toxicity and ultrastructural changes. *Environ. Experim. Bot.* 26: 97-105.

Isawa, S. 1980. Acceptors and donors for chloroplast electron transport. *Methods in enzymology* 69: 413-434.

Jones, T.W., Kemp, W.M., Estes, P.S. et J.C. Stevenson. 1986. Atrazine uptake, photosynthetic inhibition, and short-term recovery for the submersed vascular plant, *Potamogeton perfoliatus*. *L. Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 15: 277-283.

Källqvist, T. et B.S. Meadows. 1978. The toxic effect of copper on algae and rotifers from a soda lake (lake Nakuru, east Africa). *Water Research* 12: 771-775.

Kettle, W.D., deNoyelles, F.Jr, Heacock, B.D. et A.M. Kadoum. 1987. Diet and reproductive success of bluegill recovered from experimental ponds treated with atrazine. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38: 47-52.

Klaassen, C.D., M.O. Amdur et J. Doull. 1986. Casarett and Doull's Toxicology: The basis science of poisons, 3<sup>e</sup> éd., Macmillan Publishing Company, New York, 974 p.

Knobeloch, L.M., Blondin, G.A., Read, H.W. et J.M. Harkin. 1990. Assessment of chemical toxicity using mammalian mitochondrial electron transport particles. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19: 828-835.

Kojima, Y., Niinomi, Y., Tsuboi, S., Hiyama, T. et H. Sakurai. 1987. Destruction of photosystem I iron-sulfur centers of spinach and *Anacystis nidulans* by mercurials. *Bot. Mag. Tokyo* 100: 243-253.

Krupa, Z., Skorzynska, E., Marsymiec, W. et T. Baszynski. 1987. Effect of cadmium treatment on the photosynthetic apparatus and its photochemical activities in greening radish seedlings. *Photosynthetica* 21: 156-164.

Laegreid, M., Alstad, J., Klaveness, D. et H.M. Selp. 1983. Seasonal variation of cadmium toxicity toward the alga *Selenastrum capricornutum* printz in two lakes with different humus content. *Environ. Sci. Technol.* 17: 357-361.

Lehoczki, E., Polos, E., Laskay, G. et T. Farkas. 1985. Chemical compositions and physical states of chloroplast lipids related to atrazine resistance in *Conyza canadensis* L. Plant Science 42: 19-24.

Lemieux, S. et R. Carpentier. 1988. Properties of immobilized thylacoid membranes in a photosynthetic photoelectrochemical cell. Photochem. and Photobiol. 48: 115-121.

Li, E.H. et C.D. Miles. 1975. Effects of cadmium on photoreaction II of chloroplasts. Plant Sci. Lett. 5: 33-40.

Livingston, R.J. 1977. Review of current literature concerning the acute and chronic effects of pesticides on aquatic organisms. CRC critical reviews in environmental control 7: 325-351.

Mader, S.S. 1988. Biologie: Evolution, diversité et environnement. éd. Reynald Goulet. p.

McCarthy, J.F. et S.M. Bartell. 1988. How the trophic status of a community can alter the bioavailability and toxic effects of contaminants. Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals. ASTM STP 988. J. Cairns Jr. et J.R. Pratt Eds. American Society for Testing and Materials. Philadelphie. p. 3-16.

Mehler, A. 1951. Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. Arch. Biochem. Biophys. 33: 65-77.

Metzger, U., Hanke, T. et B. Ebert. 1987. Studies on the mechanism of sulfite toxicity, effects of sulfite on ESR signals of isolated thylacoids. Studia Biophys. 118: 25-34.

Miller, W.E., Peterson, S.A., Green, J.C. et C.A. Callahan. 1985. Comparative toxicology of laboratory organisms for assessing hazardous waste sites. J. Environ. Qual. 14: 569-574.

Millie, D.F. et C.M. Hersh. 1987. Statistical characterization of the atrazine-induced photosynthetic inhibition of *Cyclotella meneghiniana* (Bacillariophyta). Aquatic Toxicol. 10: 239-249.

Mimeault, M. et R. Carpentier. 1988. Electrochemical monitoring of electron transfer in thylacoid membranes. Enzyme Microb. Technol. 18: 691-694.

Mimeault, M. et R. Carpentier. 1989. Kinetics of photocurrent induction by a thylacoid containing electrochemical cell. Bioelectrochem. Bioenerg. 22: 145-158.

- Mohanty, N., I. Vass et S. Demeter. 1989. Copper toxicity effects photosystem II electron transport at the secondary quinone acceptor,  $Q_b$ . *Plant Physiol.* 90 : 175-179.
- Moreland, D.E. et W.P. Novitzky. 1984. Interference by DDT and cyclodienes types of insecticides with chloroplast-associated reactions. *Chem.-Biol. Interactions* 48: 153-168.
- Morris, G.M. et F.T. Buckley. 1984. The role of the *Daphnia* Bioassay in the assessment of the quality of effluent discharges. *Water Pollut. Control* 83: 539-46.
- Munawar, M. et I.F. Munawar. 1987. Phytoplankton bioassays for evaluating toxicity of *in situ* sediment contaminants. *Hydrobiologia* 149: 87-105.
- Murthy, S.D.S., Sabat, S.C. et P. Mohanty. 1988. Multiple effects of mercury on photoelectron transport activities of cyanobacterium *Spirulina platensis*. Proceedings of the international congress of plant physiology, New Delhi, India. p. 1241-1245.
- Neuhold, J. et L. Ruggerio. 1976. Ecosystem processes and organic contaminants. National Science Foundation, Washington, D.C. NSF-RA-760008, 41 p.
- OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique). 1974. Le mercure et l'environnement. OCDE. Paris. 207 p.
- Ohad, N. et J. Hirschberg. 1990. A similar structure of the herbicide binding site in photosystem II of plants and cyanobacteria is demonstrated by site specific mutagenesis of the *psp A* gene. *Photosynthesis Research* 23: 73-79.
- O'Neal, S.W. et C.A. Lembi. 1983. Effect of simazine on photosynthesis and growth of filamentous algae. *Weed Sci.* 31: 899-903.
- Overnell, J. 1975. The effect of some heavy metal ions on photosynthesis in a freshwater alga. *Pest. biochem. and physiol.* 5: 19-26.
- Overnell, J. 1976. Inhibition of marine algal photosynthesis by heavy metals. *Marine Biology* 38: 335-342.
- Owen, W.J., M.E. Delaney et L.J. Rogers. 1977. Studies on the sites of inhibition of photosynthetic electron transport in barley by DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane). *J. Exp. Bot.* 28: 986-98.

- Påhlsson, A.-M. B. 1989. Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. *Water, Air, and Soil Pollution* 47: 287-319.
- Pauli, B.D., Kent, R.A. et M.P. Wong. 1991. Recommandations pour la qualité de l'eau au Canada: simazine. Environnement Canada. Direction générale des eaux intérieures. Direction de la qualité des eaux. Etude no 187, série scientifique. 33 p.
- Pfister, K., Steinback, K.E., Gardner, G., et C.J. Arntzen. 1981. Photoaffinity labelling of an herbicide receptor protein in chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 981-985.
- Purcell, M. et R. Carpentier. 1990. A phytotoxicity biosensor using photosynthetic membranes. *Water Pollution Research J. of Canada* 25: 175-185.
- Purcell, M., Carpentier, R., Bélanger, D. et G. Fortier. 1990. Immobilized plant thylacoid membranes as a biosensor for herbicides. *Biotechnology Techniques* 4: 363-368.
- Rai, L.C., Gaur, J.P. et H.D. Kumar. 1981. Phycology and heavy-metal pollution. *Biol. Rev.* 56: 99-151.
- Ramade, F. 1984. *Eléments d'écologie: écologie fondamentale*. McGraw-Hill, Paris. 397 p.
- Renganathan, M. et S. Bose. 1989. Inhibition of primary photochemistry of photosystem II by copper in isolated pea chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta* 974: 247-253.
- Renganathan, M. et S. Bose. 1990. Inhibition of photosystem II activity by  $\text{Cu}^{++}$  ion. Choice of buffer and reagent is critical. *Photosynthesis Research* 23: 95-99.
- Ribo, J.M. et K.L.E. Kaiser. 1987. *Phobacterium phosphoreum* Toxicity Bioassay. 1. Test Procedures and applications. *Toxicity Assessment: An International Quaterly*. 2: 305-323.
- Roberts, S., Vasseur, P. et D. Dive. 1990. Combined effects between atrazine, copper and pH, on target and non target species. *Wat. Res.* 24: 485-491.
- Robinson, J.M. 1988. Does  $\text{O}_2$  photoreduction occur within chloroplasts in vivo? *Physiol. Plant.* 72: 666-680.

Ross, P., Jarry V. et H. Sloterdijk. 1988. A rapid bioassay using the green alga *Selenastrum capricornutum* to screen for toxicity in St-Lawrence river sediment elutriates. Functional testing of aquatic biota for estimating hazards of chemicals, ASTM STP 988, Cairns, Jr. et J.R. Pratt éd., ASTM, Philadelphie, pp. 68-73.

Sahu, A., Shaw, B.P., Panigrahi, A.K. et B.N. Misra. 1988. Effects of phenyl mercuric acetate on oxygen evolution in a nitrogen fixing blue-green alga, *Westiellopsis prolifica* Janet. Microbios Letters 37: 119-123.

Saint-Laurent, D., Blaise, C., Macquarrie, P., Scroggins, R. et B. Trottier. 1992. Comparative assessment of herbicide phytotoxicity to *Selenastrum capricornutum* using microplate and flask bioassay procedures. Environ. Toxicol. and water quality: an international journal (à paraître).

Salin, M.L. 1987. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. Physiol. Plant. 72: 681-689.

Salisbury, F.B. et C.W. Ross. 1985. Plant physiology. Wadsworth Publishing Company. Belmont, Californie. 540 p.

Sandmann, G. et P. Böger. 1980. Copper deficiency and toxicity in *Scenedesmus*. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 98: 53-59.

Shaw, B.P., A. Sahu et A.K. Panigrahi. 1988. Effects of the effluent from a chlor-alkali factory on a blue-green alga: changes in the oxygen evolution rate. Microbios Letters 37: 89-96.

Shieh, Y.J. et J. Barber. 1973. Uptake of mercury by *Chlorella* and its effect on potassium regulation. Planta 109: 49-60.

Shimazaki, K.-i., Nakamachi, K., Kondo, N. et K. Sugahara. 1984. Sulfite inhibition of photosystem II in illuminated spinach leaves. Plant and Cell Physiol. 25: 337-341.

Shioi, Y., Tamai, H. et S. Tsutomu. 1978. Inhibition of photosystem II in the green alga *Ankistrodesmus falcatus* by copper. Physiol. Plant. 44: 434-438.

Sikka, H.C. et G.L. Butler. 1977. Effects of selected wastewater chlorination products on marine algae. Gulf Breeze, Florida. U.S. E.P.A. 45 p.

Sinclair, J. 1987. Changes in spinach thylacoid activity due to nitrite ions. Photosynth. Res. 12: 255-263.



Singh, D.P., P. Khare et P.S. Bisen. 1989. Effects of  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ , and  $\text{Cu}^{2+}$  on growth, oxygen evolution and photosynthetic electron transport in *Cylindrospermum* IU 942. J. Plant Physiol. 134: 406-412.

Stratton, G.W. 1984. Effects of the herbicide atrazine and its degradation products, alone and in combination, on phototrophic microorganisms. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 13: 35-42

Stratton, G.W. 1987. The effects of pesticides and heavy metals towards phototrophic microorganisms. Review in env. toxicol. 3: 71-127.

Stratton, G.W. et C.T. Corke. 1979a. The effect of cadmium ion on the growth, photosynthesis, and nitrogenase activity of *Anabaena inaequalis*. Chemosphere 5: 277-282.

Stratton, G.W. et C.T. Corke. 1979b. The effect of nickel on the growth, photosynthesis, and nitrogenase activity of *Anabaena inaequalis*. Can. J. Microbiol. 25: 1094-1099.

Sunda, W. et R.R.L. Guillard. 1976. The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. J. Mar. Res. 34: 511-529.

Sunda, W. et J.M. Lewis. 1978. Effect of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular alga *Monochrystis lutheri*. Limnol. Oceanogr. 23: 870-876.

Swanson, S. et H. Peterson. 1992. Development of guidelines for testing pesticide toxicity to non-target plants. Environmental Protection Series, Environnement Canada, Ottawa, Canada (sous presse).

Teige, M., Huchzermeyer, B. et G.Schultz. 1990. Inhibition of chloroplast ATPsynthase/ATPase is a primary effect of heavy metal toxicity in spinach plants. Biochem. Physiol. Pflanzen 186: 165-168.

Thiel, A. et P. Boger. 1986. Binding of ioxynil to photosynthetic membranes. Pestic. Biochem. Physiol. 25: 270-278.

Trebst, A. 1980. Inhibitors in electron flow: tools for the fonctionnal and structural localization of carriers and energy conservation sites. Methods Enzymol. 69: 675-715.

Tripathy, B.C. et P. Mohanty. 1980. Zinc-inhibited electron transport of photosynthesis in isolated barley chloroplasts. Plant Physiol. 66: 1174-1178.

Uribe, E.G. et B. Stark. 1982. Inhibition of photosynthetic energy conversion par cupric ion. *Plant Physiol.* 69: 1040-1045.

Vermass, W.F.J., Renger, G. et C.J. Arntzen. 1984. Herbicide/quinone binding interactions in photosystem II. *Z. Naturforsch.* 39c: 368-373.

Vierke, G. et P. Struckmeier. 1978. Inhibition of millisecond luminescence by copper(II) in spinach chloroplasts. *Z. Naturforsch.* 33c: 266-270.

Walsh, G.E. 1972. Effects of herbicides on photosynthesis and growth of marine unicellular algae. *Hyacinth Control J.* 10: 45-48.

Wildner, G.F., Heisterkamp, U. et A. Trebst. 1990. Herbicide cross-resistance and mutations of the *psbA* gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Z. Naturforsch.* 45c: 1142-1150.

Wong, P.T.S., Chau, Y.K. et D. Patel. 1982. Physiological and biochemical responses of several freshwater algae to a mixture of metals. *Chemosphere* 11: 367-376.

Woolhouse, H.W. 1983. Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. p.245-300. Dans: *Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. 12C, *Physiological Plant Ecology* 111. Lange, O.L., P.S. Nobel, C.B. Osmond et H. Ziegler Eds. Springer-Verlag. Berlin. 749 p.

Wu, J.T. et H. Lorenzen. 1984. Effect of copper on photosynthesis in synchronous *Chlorella* cells. *Bot. Bull. Academia Sinica* 25: 125-132.

Wurtsbaugh, W.A. et A.J. Horne. 1982. Effects of copper on nitrogen fixation and growth of blue-green algae in natural plankton associations. *Can J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 1636-1641.